

Aus dem Institut für Immunologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Dietrich Kabelitz)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Expression und funktionelle Bedeutung von
Toll-like Rezeptoren in
 $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulationen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Kathrin Pietschmann

aus Kiel

Kiel 2011

Referentin:	PD Dr. Daniela Wesch
Koreferentin:	Prof. Dr. Susanne Sebens
Tag der mündlichen Prüfung:	19.01.2012

Abkürzungen

APZ	Antigen präsentierende Zelle
CBA	Cytometric Bead Array
CC/CXCL	CC/CXC-Chemokin-Ligand
CC/CXCR	CC/CXC-Chemokin-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CHAK	Chemokin aktivierte Killerzellen
CSF	Colony stimulating Factor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorter
GM-CSF	Granulozyten- und Monozyten-CSF
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
IP	Interferon- γ induziertes Protein
LAK	Lymphokin aktivierte Killerzellen
LPS	Lipopolysacharid
LTA	Lipoteichonsäure
MACS	Magnetic-activated Cell Sorting
mAK	monoklonaler Antikörper
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP	Makrophagen-Inflammationsprotein
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAMP	Pathogen-associated Molecular Patterns

PBMZ	periphere mononukleäre Blutzellen
PRR	Pattern Recognition Receptor
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted
(m)RNA	(Boten-) Ribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
ssRNA	einzelsträngige Ribonukleinsäure
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zellrezeptor
ZTL	zytotoxische T-Lymphozyten

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1-18
1.1 T-Zellen	1
1.1.1 $\gamma\delta$ -T-Zellen	3
1.2 Zytokine und Chemokine	5
1.2.1 Zytokine	5
1.2.2 Zytokine im Detail	6
1.2.3 Chemokine	9
1.2.4 Chemokine im Detail	10
1.2.5 Chemokinrezeptorexpression	11
1.3 Toll-like Rezeptoren	12
1.3.1 TLR-Expression und Funktion	12
1.3.2 TLR-Expression auf T-Zellen und weitere Funktionen	14
1.4 Caspasen und Zelltod	17
2. Fragestellung	19
3. Material und Methoden	20-32
3.1 Material	20
3.1.1 Buffy coats	20
3.1.2 Lösungen, Puffer und Zusätze	20
3.1.3 Medium	20
3.1.4 Material für MACS	20
3.1.5 Antikörper	21
3.1.6 Kit für intrazelluläre Färbungen	23
3.1.7 TLR-Liganden/-Agonisten	24
3.1.8 Kit für Cytokine Bead Array	24
3.1.9 Kit für ELISA	24
3.1.10 Kit für Caspase-Glo 3/7 Assay	24
3.1.11 Verbrauchsmaterialien	24

3.2 Methoden	25
3.2.1 Spenderauswahl	25
3.2.2 Gewinnung von PBMZ	25
3.2.3 Bestimmung der Zellzahl und –vitalität	25
3.2.4 Isolierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen durch MACS	26
3.2.5 Trennung der $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulationen mit Sorter	26
3.2.6 Stimulation der Subpopulationen mit TLR-Liganden	27
3.2.7 CBA	28
3.2.8 IFN- γ -ELISA	29
3.2.9 Immunfluoreszenzfärbung	30
3.2.10 Caspasen-Bestimmung	31
3.2.11 Statistische Methoden	32
 4. Ergebnisse	33-56
4.1 TLR-Expression auf/in $\gamma\delta$ -T-Zellen	33
4.2 Funktionelle Eigenschaften der TLR in $\gamma\delta$ -T-Zellen	34
4.2.1 Stimulation des TLR3 mit Poly(I:C)	35
4.2.2 Stimulation des TLR7 mit Imiquimod	42
4.2.3 Stimulation der TLR1,2 und 6 mit Pam ₂ CSK4, Pam ₃ CSK4 und FSL-1	44
4.2.4 Stimulation von TLR5 mit Flagellin	51
4.3 Einfluss der Markierung mit Antikörpern auf die Zytokin-Freisetzung	53
4.4 Nachweis von Caspase-Aktivierung als Zelltod-Parameter	54
 5. Diskussion	57-69
 6. Zusammenfassung	70-71
 7. Literaturverzeichnis	72-85
 Anhang: Publikationen	
Danksagung	
Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1 T-Zellen

Die T-Zellen gehören wie die B-Zellen zu den Lymphozyten und entstehen aus denselben lymphatischen Progenitorzellen im Knochenmark. Beide Gruppen gehören zur spezifischen Abwehr des Körpers bzw. zur erworbenen oder adaptiven Immunität. Sie unterscheiden sich dadurch, dass ihre Reifung in unterschiedlichen primären lymphatischen Organen stattfindet. Während die B-Zellen im Knochenmark reifen, steht das „T“ der T-Zellen für Thymus. In diesem Organ kommt es zur Reifung, Differenzierung und Selektion der T-Vorläuferzellen (Thymozyten).

Während der intrathymischen Reifung findet das sogenannte Gen-Rearrangement statt. Es werden Gene aus dem verfügbaren Keimbahn-Repertoire der variablen (V), Diversifikations- (D), Verknüpfungs- (J) und konstanten (C) Gensegmente rekombiniert, um die T-Zellrezeptorvielfalt zu erhöhen, damit möglichst viele unterschiedliche Antigene erkannt werden können.

Des Weiteren werden die Thymozyten einer Selektion unterzogen. Thymozyten, welche mit hoher Affinität auf körpereigene Strukturen reagieren, werden durch negative Selektion eliminiert. Thymozyten mit geringer Affinität für Selbst-MHC („major histo-compatibility complex“) werden positiv selektioniert.

Am Anfang ihrer Reifung, die unter anderem durch diverse Zytokine gesteuert wird (Norment et al., 2000), exprimieren Thymozyten neben dem T-Zellrezeptor die Oberflächenantigene CD4 und CD8. Im Rahmen der intrathymischen Differenzierung verlieren sie einen der beiden Marker CD4 oder CD8. In der Peripherie sind die T-Zellen einfach positiv für eines dieser Oberflächenantigene und lassen sich wie folgt unterscheiden:

a) $CD8^{+}/CD4^{-}$ **zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL):**

erkennen die Antigene in Form von Peptiden im Kontext mit MHC-Klasse I Molekülen. MHC steht für „major histo-compatibility complex“ (Haupthistokompatibilitätskomplex), ein für jedes Individuum spezifisches Antigen-Muster auf der Oberfläche der Zellen. MHC-Klasse I wird auf der Oberfläche aller kernhaltigen Körperzellen exprimiert, während Klasse II nur auf Antigen

präsentierenden Zellen (APZ), B-Zellen und (beim Menschen) auf aktivierten T-Zellen zu finden ist. Wenn also eine Körperzelle durch Virusbefall oder Mutation ein fremdartiges Peptidmuster präsentiert, wird sie durch die ZTL erkannt und durch die Freisetzung von Perforinen und Granzymen oder durch Zell-Zell-Interaktion (z.B. Fas/Fas-Ligand-System) zerstört.

b) CD4⁺/ CD8⁻ T-Helferzellen:

erkennen ebenfalls Peptid-Antigene, aber in Kombination mit MHC-Klasse II, weshalb sie auf APZ angewiesen sind, die ihnen fremdes, prozessiertes Protein auf ihrer Oberfläche präsentieren. Daraufhin produzieren die T-Helferzellen verschiedene Zytokine und Chemokine, um weitere Zellen des Immunsystems zu stimulieren.

T-Zellen können funktionell in folgende unterschiedliche Gruppen klassifiziert werden:

- 1) TH1-Zellen sezernieren im Wesentlichen Interferon- γ (IFN- γ), wodurch z.B. Makrophagen zur Phagozytose von intrazellulären Pathogenen stimuliert werden.
- 2) TH2-Zellen setzen Interleukin (IL)-4, IL-5, IL-10 und IL-13 frei, sodass unter anderem B-Zellen zur Proliferation und zur Produktion von Antikörpern gegen extrazelluläre Bakterien und Allergene angeregt werden (Kaufmann u. Kabelitz, 2010).

TH1- und TH2-Zellen entstehen aus TH0 Zellen in Abhängigkeit vom lokalen Zytokin-Milieu.

- 3) TH17-Zellen produzieren IL-17-A, IL-17-F und IL-22 und dienen als proinflammatorische Zellen der Abwehr von einwandernden Bakterien an Barrieren, z.B. an der Darmmukosa (Weaver et al., 2009).
- 4) Die regulatorischen T-Zellen (Treg) zeichnen sich aus durch eine starke Expression von CD25 (α -Kette des IL-2 Rezeptors) und dem Transkriptionsfaktor "Forkhead-box P3" (FoxP3).

Treg spielen eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz. Sie hemmen durch direkten Zell-Kontakt die Aktivität der Effektorzellen, um eine überschießende Immunantwort bzw. eine Autoimmunreaktion zu verhindern (Kabelitz et al., 2006).

1.1.1 $\gamma\delta$ -T-Zellen

Alle T-Zellen erkennen mit Hilfe ihres TZR unterschiedliche Antigene. Der T-Zellrezeptor, welcher auf allen reifen T-Zellen exprimiert ist, besteht aus einem $\alpha\beta$ -Ketten heterodimeren Protein. Neben diesen sogenannten $\alpha\beta$ -T-Zellen gibt es eine kleine Untergruppe von T-Zellen, die einen alternativen $\gamma\delta$ -TZR exprimieren. $\gamma\delta$ -T-Zellen erkennen phosphorylierte niedermolekulare Nicht-Peptid-Antigene. Sie reagieren stark auf einige Parasiten, z.B. *Plasmodium falciparum* (Behr et al., 1996) und Bakterien wie *Mycobacterium tuberculosis* (Kabelitz et al., 1990). Deren phosphorylierte Metabolite aus dem Syntheseweg der Isoprenoide (Phosphoantigene), wie z.B. (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-Diphosphat (HMB-PP) werden von $\gamma\delta$ -TZR erkannt und aktivieren die $\gamma\delta$ -T-Zellen direkt (Hintz et al., 2001).

Ferner erkennen $\gamma\delta$ -T-Zellen Alkylamine, die aus Pflanzenextrakten (z.B. Tee, Apfel, Mistel) isoliert werden können, und Aminobisphosphonate, welche therapeutisch in der Krebstherapie und bei Osteoporosepatienten eingesetzt werden (Luckmann et al., 2005). Sowohl Alkylamine als auch Aminobisphosphonate hemmen die Farnesyl-Pyrophosphat-Synthase im Mevalonat-Stoffwechselweg zur Synthese von z.B. Cholesterin, sodass die vorgeschalteten Zwischenprodukte dieses Stoffwechselweges intrazellulär akkumulieren. Die Stimulation von ruhenden $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Abwesenheit von APZ mit Aminobisphosphonat bewirkt im Gegensatz zur Stimulation mit Phosphoantigen keine Aktivierung (Ohnesorge et al., 2009). Erst durch direkten Zellkontakt mit Aminobisphosphonat behandelten Monozyten, in welchen Pyrophosphate intrazellulär akkumulieren, kommt es zur Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen (Roelofs et al., 2008). Diese indirekte Stimulation induziert in den $\gamma\delta$ -T-Zellen eine verstärkte Proliferation und IFN- γ -Produktion.

Die Hemmung der Farnesyl-Pyrophosphat-Synthase in Osteoklasten und Tumorzellen wird therapeutisch bei Knochen abbauenden Erkrankungen wie Osteoporose und Skelettmetastasen genutzt. Die Aminobisphosphonate hemmen durch Minderung der Isoprenoidsynthese die Metastasierung von Tumorzellen in Knochengewebe (Mönkkönen et al., 2007). Außerdem bewirkt die intrazelluläre Akkumulation der Zwischenprodukte eine indirekte Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen und fördert deren anti-tumoröse Eigenschaften (Caccamo et al., 2008). Die $\gamma\delta$ -T-Zellen können Tumorzellen über die Freisetzung von zytotoxischen Mediatoren (Granzyme, Perforine) oder über das Fas/Fas-Ligand-System lysieren (Wesch et al., 2005).

Die Antigen-Erkennung erfolgt bei $\gamma\delta$ -T-Zellen unabhängig von MHC-Molekülen und Prozessierung, jedoch über den TZR (Hayday et al., 2000, Kabelitz et al., 2000). $\gamma\delta$ -T-Zellen vereinen sowohl Eigenschaften der angeborenen als auch der erworbenen Immunität und verbinden damit beide Systeme (Holtmeier u. Kabelitz, 2005). Eine Subpopulation der $\gamma\delta$ -T-Zellen kann auch Antigen-präsentierende Funktionen, in ähnlichem Maße wie dendritische Zellen, erfüllen (Moser u. Brandes, 2006).

Aufgrund ihrer verwendeten variablen TZR-Gensegmente lassen sich die humanen $\gamma\delta$ -T-Zellen in unterschiedliche Subpopulationen aufteilen:

Zur $V\gamma 1$ -Familie gehören die Zellen, die ein $V\gamma 2$, 3, 4, 5 oder 8-Gensegment exprimieren, häufig in Kombination mit einem $V\delta 1$ -Gensegment. Sie kommen hauptsächlich in Epithelien des Verdauungstraktes, im Uterus, in der Lunge, in lymphatischen Organen und in geringer Anzahl auch in der Haut und im Blut vor (Holtmeier et al., 2001 u. 2003). Beim gesunden Menschen exprimieren innerhalb der Blutlymphozyten weniger als ein Prozent $V\delta 1$ auf ihrer Oberfläche. Bei einigen Viruserkrankungen wie HIV-Infektionen (Hinz et al., 1994) oder Hepatitis C (Poccia et al., 2001) ist die Anzahl der $V\delta 1$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen vermehrt.

Die Mitglieder der $V\gamma 11$ -Familie exprimieren $V\gamma 9$ - in Kombination mit einem $V\delta 2$ -Element und kommen überwiegend im Blut vor. $V\delta 2$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen machen ca. ein bis zehn Prozent der Lymphozyten aus und ca. 80 bis 90 Prozent der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Blut (Porcelli et al., 1991).

Abhängig vom umgebenden Zytokinmilieu und von Antigenen produzieren $\gamma\delta$ -T-Zellen verschiedene Botenstoffe. Anhand des Zytokin-Musters können sie wie die anderen T-Zellen in TH1- und TH2-Zellen aufgeteilt werden:

Nach ihrer Stimulation durch Antigene von Mykobakterien produzieren $V\delta 2$ -T-Zellen pro-inflammatorische TH1-Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ (Tsukaguchi et al., 1999). Frisch isolierte, ruhende $V\delta 2$ -T-Zellen aus dem Blut produzieren nach initialer Stimulation mit Phosphoantigen oder Lymphomzellen $\text{IFN-}\gamma$. Die $\text{IFN-}\gamma$ -Produktion kann durch den Einsatz von IL-12 noch gesteigert werden. Durch die Zugabe von IL-12 und Antikörpern gegen IL-4 können $\gamma\delta$ -T-Zellen zu $\text{IFN-}\gamma$ produzierenden TH1-Zellen differenzieren. Der Einsatz von IL-4 und Antikörpern gegen IL-12 führt dagegen zur Differenzierung von IL-4 produzierenden $\gamma\delta^+$ TH2-Zellen (Wesch et al., 2001). Ferner können $\gamma\delta$ -T-Zellen auch in TH17-Zellen differenzieren (Ness-Schwickerath et al., 2010).

V δ 1-T-Zellen produzieren unter anderem Insulin-like growth factor (IGF)-1 zur Unterstützung der lokalen Wundheilung (Toulon et al., 2009) und können auch TNF- α und IFN- γ zur Aktivierung weiterer Immunzellen produzieren.

Zur Proliferation und optimalen Aktivierung benötigen ruhende $\gamma\delta$ -T-Zellen IL-2 oder die Anwesenheit von IL-2 produzierenden $\alpha\beta$ -T-Zellen (Pechhold et al., 1994). Aus diesem Grund wird bei der Immuntherapie von malignen Tumorerkrankungen neben den $\gamma\delta$ -T-Zell-stimulierenden Substanzen (z.B. Aminobisphosphonaten) auch immer eine geringe Dosis an IL-2 appliziert.

1.2 Zytokine und Chemokine

Zytokine sind lösliche Proteine, die der „Kommunikation“ der Zellen untereinander dienen. Nach Stimulation ihrer Produktion, z.B. durch T-Helferzellen oder andere Immunzellen, werden sie in die Umgebung freigesetzt. Zytokine wirken über die Bindung an spezifische Rezeptoren auf die produzierende Zelle selbst (autokrine Wirkung), auf benachbarte Zellen (parakrine Wirkung) oder über den Blutstrom auf entfernt gelegene Zellen (endokrine Wirkung). Ferner induzieren Zytokine die Proliferation, die Differenzierung oder Aktivierung von Zielzellen (z.B. andere Immunzellen), können aber auch das Wachstum hemmen oder Zelltod induzieren (z.B. von Tumorzellen oder Immunzellen) (Janeway et al., 2009).

1.2.1 Zytokine

Die Zytokine lassen sich in verschiedene Klassen unterteilen:

- 1) **Interferone** werden als Antwort auf virale oder bakterielle Infektionen, insbesondere nach Erkennung von doppelsträngiger RNA (dsRNA) produziert und können über Genregulation anti-infektiöse und anti-tumöröse Prozesse in Gang setzen. IFN unterscheiden sich in struktureller und physiochemischer Hinsicht. Zu den Typ-I-Interferonen gehören IFN- α und IFN- β . IFN- α wird von Leukozyten, virusinfizierten Zellen und deren Nachbarzellen freigesetzt und induziert den Abbau von viraler und bakterieller RNA sowie eine Hemmung der Proteinsynthese. IFN- β wird von Fibroblasten gebildet, bindet an den gleichen Rezeptor wie IFN- α und hat eine ähnliche Wirkung wie IFN- α .

Das TypII-Interferon IFN- γ wird u.a. von aktivierten T-Lymphozyten (verstärkt von $\gamma\delta$ -T-Zellen) und NK-Zellen gebildet. IFN- γ bindet an einen separaten Rezeptor und hat ebenfalls eine anti-virale Wirkung, aktiviert aber hauptsächlich Makrophagen.

Alle IFN aktivieren zudem NK-Zellen, Makrophagen und ZTL und beeinflussen die Expression von MHC-Klasse I Molekülen, während IFN- γ zusätzlich die Expression von MHC-Klasse II Molekülen induziert (Cebulla et al., 1999, Alexander et al., 2009). Klinisch wird IFN- β z.B. bei Multipler Sklerose immunmodulatorisch eingesetzt, um das Auftreten von Schüben zu verringern (Boyko, 2010). Bei chronischer Hepatitis C dient der Einsatz von IFN- α dazu, die Viruslast zu verringern (Gattoni et al., 2006).

- 2) **Interleukine** dienen der „Verständigung“ der Leukozyten untereinander und haben viele unterschiedliche Wirkungen. Sie können die Aktivität, Teilung und Reifung anderer Immunzellen fördern oder hemmen und werden nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit zusätzlichen Zahlen gekennzeichnet.
- 3) Kolonie stimulierende Faktoren (colony stimulating factors / **CSF**) regulieren Proliferation, Differenzierung und Wachstum der Vorläuferzellen von Erythrozyten und Leukozyten.
- 4) **Tumornekrosefaktoren** sind an lokalen und systemischen Entzündungsreaktionen beteiligt und regulieren die Aktivität der Immunzellen. Man unterscheidet zwischen dem von Makrophagen produzierten TNF- α und dem von Lymphozyten produzierten TNF- β (Janeway et al., 2009).

1.2.2 Zytokine im Detail

IFN- γ fördert als inflammatorisches TH1-Zytokin die Differenzierung der T-Zellen zu ZTL, aktiviert NK-Zellen und Makrophagen. IFN- γ kann jedoch auch die Zellproliferation inhibieren und Ig Fc-Rezeptoren induzieren. Die anti-virale Wirkung wird durch die Induktion von IFN-abhängigen Enzymen induziert, welche in Gegenwart von dsRNA die virale Proteinsynthese hemmen.

IFN- γ fördert die Monozytendifferenzierung, aktiviert die anti-mikrobielle Funktion der Makrophagen und stimuliert B-Zellen zur Antikörperproduktion. Zusätzlich stimuliert es die IL-1- und IL-2-Synthese (Schroder et al., 2004).

$\gamma\delta$ -T-Zellen produzieren nach Kontakt mit nicht-peptidischen, bakteriellen Antigenen große Mengen an IFN- γ (Garcia et al., 1997). Neben IFN- γ wird auch die Induktion von **TNF- α** , einem weiteren TH1-Zytokin durch TZR-Stimulation bei $\gamma\delta$ -T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen ausgelöst (Tsukaguchi et al., 1999). TNF- α wird außerdem durch Makrophagen, aktivierte NK-Zellen, Mastzellen, Endothelzellen u. a. gebildet. TNF- α fördert neben seiner anti-tumoralen und anti-viralen Wirkung Entzündungsreaktionen, indem vermehrt Arachidonsäurederivate ausgeschüttet werden. Bei Infektionen dient TNF- α der lokalen Begrenzung, indem kleine Gefäße durch lokal geförderte Blutgerinnung verschlossen werden und der Einstrom von Immunzellen ins Gewebe gefördert wird. Systemisch verursacht TNF- α durch die Steigerung der IL-1-Produktion und Erhöhung der ProstaglandinE2-Synthese im Hypothalamus Fieber (Dinarello, 2000). Des Weiteren kann TNF- α Apoptose bei infizierten Zellen induzieren, Zellproliferation und Zelldifferenzierung der spezifischen Abwehr und deren Zytokinproduktion (IL-1, IL-6, IFN- γ) aktivieren, die Phagozytose von Makrophagen und die Migration neutrophiler Granulozyten fördern. Außerdem kann TNF- α am septischen Schock, ausgelöst durch Gram-negative Bakterien, beteiligt sein (Dinarello, 2000).

IL-1 β wirkt synergistisch mit TNF- α . Es kann von vielen verschiedenen Zellarten einschließlich Makrophagen, Monozyten, Thrombozyten und Neutrophilen produziert werden. Neben zahlreichen Wirkungen spielt es eine Rolle in Entzündungsreaktionen und stimuliert die Reifung und Proliferation von Thymozyten, T-Zellen, NK-Zellen und B-Zellen durch IL-2-Induktion (Dinarello, 1988).

Interleukin-2 (IL-2) wird überwiegend von CD4⁺T-Zellen (besonders nach deren Aktivierung über den TZR) produziert und aktiviert sowohl autokrin als auch parakrin die Proliferation und Zytokinproduktion von Zellen und unreifen Thymozyten. Ruhenden $\gamma\delta$ -T-Zellen, die IL-2 selbst nicht produzieren können, dient es als Proliferations- und Aktivierungsfaktor. Aktivierte $\gamma\delta$ -T-Zellen können IL-2 nur in geringen Mengen produzieren (Pechhold et al., 1994). IL-2 induziert in $\gamma\delta$ -T-Zellen

eine verstärkte IFN- γ -Produktion (Lafont et al., 2003). IL-2 verstärkt die Makrophagenzytotoxizität und wirkt kostimulierend auf die B-Zellproliferation und – differenzierung und auf deren Immunglobulinproduktion. Außerdem erhöht es die zytotoxische bzw. anti-tumoröse Aktivität von NK-Zellen, LAK-Zellen (= Lymphokin aktivierte Killerzellen) und ZTL (Kuziel u. Greene, 1990).

IL-4 und -10 sind typische TH2-Zytokine, d.h. sie werden von T-Helferzellen produziert, die die humorale Abwehr fördern. Sie wirken beide als IFN- γ -Antagonisten anti-inflammatorisch und stimulieren die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen. Außerdem aktivieren sie ruhende B-Zellen und fördern deren Entwicklung zu Plasmazellen bzw. deren Immunglobulin-Produktion, wodurch die Entwicklung von Allergien begünstigt werden kann. $\gamma\delta$ -T-Zellen produzieren geringe Mengen von IL-4 und IL-10 nach bakterieller Stimulation (Wesch et al., 2005).

IL-4 dient in Kombination mit IL-1 als autokriner Wachstumsfaktor von aktivierten TH2-Zellen. Es induziert ZTL und fördert die Reifung der Thymozyten. Des Weiteren steigert IL-4 die Expression von MHC-Klasse II-Molekülen und die Antigenpräsentation, induziert Makrophagen-CSF und Granulozyten-CSF, fördert die Proliferation und Reifung von Mastzellen und hämatopoetischen Stammzellen und induziert die Expression von CD23 auf Monozyten (Brown u. Hural, 1997).

IL-10 wird neben den TH0- und TH2-Zellen auch von aktivierten B-Zellen, Monozyten/ Makrophagen und anderen APZ produziert. Es wirkt anti-inflammatorisch, indem es die Reifung von TH1-Zellen und deren Zytokinproduktion hemmt. IL-10 inhibiert auch eine *Mycobacterium tuberculosis* induzierte $\gamma\delta$ -T-Zellproliferation (Marx et al., 1997). Außerdem wirkt es auf die MHC-Klasse II-Expression bei Monozyten/ Makrophagen hemmend und bei B-Zellen fördernd (Couper et al., 2008). Es ist bislang unbekannt, ob die IL-10-Produktion nach TZR-Stimulation durch zusätzliche Stimuli wie z.B. Toll-like Rezeptor (TLR)-Liganden gesteigert werden kann.

IL-6 wird hauptsächlich von Leukozyten (in geringen Mengen auch von $\gamma\delta$ -T-Zellen), Monozyten und Makrophagen nach Kontakt mit Bakterien, aber auch von Epithel und Endothel freigesetzt. Es fördert bei einer akuten Entzündung den Übergang der unspezifischen Abwehr durch neutrophile Granulozyten hin zur erworbenen, spezifischen Abwehr durch Lymphozyten. IL-6 fördert die Apoptose der Granulozyten und hemmt die der T-Lymphozyten. Ferner stimuliert IL-6 die Proliferation und

Differenzierung der B-Lymphozyten (Kishimoto, 2010). Klinisch dient es als Prognosefaktor bei einer Sepsis (Gullo et al., 2010).

IL-12 wird von dendritischen Zellen und Makrophagen produziert und fördert die Differenzierung von T-Zellen zu TH1-Zellen. Es induziert IFN- γ , TNF- α und IL-2 und initiiert damit die TH1-Zellantwort und verlängert ihren Aktivierungszustand (Hsieh et al., 1993).

Der Granulozyten und Monozyten stimulierende Faktor (**GM-CSF**) ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor, der von Endothelzellen, Monozyten, Fibroblasten und T-Zellen produziert wird. Auch $\gamma\delta$ -T-Zellen sind in der Lage nach bakterieller Stimulation GM-CSF zu produzieren (Wesch et al., 2005). GM-CSF stimuliert die Reifung von Neutrophilen und Makrophagen und fördert die Proliferation und Differenzierung von unreifen Megakaryozyten und eosinophilen Vorläuferzellen, sowie von Monozyten und dendritischen Zellen. Zudem hemmt dieser Faktor die Migration der neutrophilen Granulozyten und erhöht die Aktivität reifer Zellen (Rapoport et al., 1992).

1.2.3 Chemokine

Chemokine wirken chemotaktisch auf ihre Zielzellen, d.h. sie locken die Zielzellen entlang ihres Konzentrationsgradienten in bestimmte Gewebe, wo eine verstärkte Immunreaktion stattfinden soll. Die Chemokine werden anhand ihrer Strukturunterschiede in vier verschiedene Klassen unterteilt: C-, CC-, CXC- und CXC3-Chemokine (Zlotnik et al., 2000). Die CC-Chemokine enthalten in ihrem aminoterminalen Bereich zwei nebeneinander liegende Cystein-Reste, während sich zwischen den beiden Cystein-Resten der CXC-Chemokine eine weitere Aminosäure befindet. Die Liganden, also die Chemokine selbst, werden mit einem „L“ gekennzeichnet (z.B. CCL5), während die zugehörigen Rezeptoren mit einem „R“ bezeichnet werden (z.B. CCR5). Ein Rezeptor ist jedoch nicht immer nur spezifisch für einen Liganden (Rossi u. Zlotnik, 2000).

1.2.4 Chemokine im Detail

TH1-polarisierte $\gamma\delta$ -T-Zellen produzieren neben IFN- γ und TNF- α die pro-inflammatorischen Chemokine CCL3, CCL4 und CCL5 (Cipriani et al., 2000).

Makrophagen-Inflammaprotein **MIP-1 α** (CCL3) und **MIP-1 β** (CCL4) sind Chemokine, die u.a. von Makrophagen z.B. nach Stimulation durch bakterielle Endotoxine produziert werden. Nach Eindringen von bakteriellen oder viralen Pathogenen oder von Parasiten oder Pilzen in ein Gewebe regulieren diese Entzündungsmediatoren die Einwanderung und den Aktivierungsstatus der verschiedenen Immunzellen, wie Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten, dendritischen und NK-Zellen (Driscoll, 1994). Die beiden Proteine unterscheiden sich in ihrer Wirkung auf Lymphozyten: Während MIP-1 α nur CD8⁺ T-Zellen anlockt, zieht MIP-1 β selektiv CD4⁺ T-Zellen an (Tedla et al., 1998). Beide Chemokine werden von V δ 2-T-Zellen produziert (Poccia et al., 1999) und bieten einen Schutz vor Infektionen mit dem humanen Immunodefizienz-Virus (HIV), indem sie an den zellulären Rezeptor CCR5 binden und somit das Eindringen des Virus in die Zelle verhindern (Olbrich et al., 1999).

CCR5 ist der Rezeptor für CCL3, CCL4 und CCL5 (RANTES). **RANTES** steht für „Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted“. Es ist ein Chemokin, das von zirkulierenden T-Zellen, so auch von $\gamma\delta$ -T-Zellen und T-Zellklonen in Kultur freigesetzt wird. RANTES wirkt chemotaktisch auf T-Zellen, Eosinophile und Basophile und bringt Leukozyten und Monozyten aus dem Blut in entzündetes Gewebe. Es fördert die Proliferation und Aktivierung von Killerzellen, CHAK (CC-Chemokin-aktivierte Killerzellen) genannt, und die Freisetzung von Histamin (Conti u. DiGioacchino, 2001). Wenn RANTES von CD8⁺ T-Zellen freigesetzt wird, hemmt es das HIV (Ward u. Westwick, 1998).

TH2-polarisierte $\gamma\delta$ -T-Zellen produzieren unter anderem das Chemokin CXCL8 (Dagna et al., 2002), das dem IL-8 entspricht. **IL-8** wird u. a. von Monozyten, Epithel- und Endothelzellen produziert. Es fördert die Migration von Basophilen, T-Zellen und Endothelzellen in entzündetes Gewebe und kann Monozyten aktivieren und die Histaminproduktion der Basophilen regulieren. Außerdem dient es der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten (Baggiolini u. Clark-Lewis, 1992) und fördert deren Degranulation bei bakteriellen Infektionen und spielt auch eine Rolle in einigen viralen Infektionen (Bickel, 1993).

Interferon- γ induziertes Protein (**IP-10**, CXCL10) wird von vielen unterschiedlichen Zellen, z.B. T-Lymphozyten, Neutrophilen, Monozyten, Keratinozyten, Hepatozyten, Osteoblasten hergestellt und nicht nur durch IFN- γ , sondern auch durch Lipopolysacharid (LPS) (über TLR4), IL-1 β , TNF- α , IL-12 und Viren induziert. Es wirkt chemotaktisch auf aktivierte CD4⁺ T-Zellen, hemmt die Angiogenese und hat einen Thymus abhängigen anti-tumorösen Effekt. IP-10 hemmt außerdem die Proliferation der frühen gesunden und der leukämischen Progenitorzellen (Neville et al., 1997). Es ist beteiligt an vielen Entzündungsprozessen, wie HIV-Enzephalitis, kutaner T-Zelllymphome und chronischer Hepatitis C (Larrubia et al., 2008).

1.2.5 Chemokinrezeptorexpression

Die Subpopulationen der $\gamma\delta$ -T-Zellen unterscheiden sich in der Expression von Chemokin-Rezeptoren:

Generell exprimieren $\gamma\delta$ -T-Zellen mehr Chemokin-Rezeptoren als $\alpha\beta$ -T-Zellen. V δ 2-T-Zellen exprimieren vermehrt CCR5, den Rezeptor für RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β (Glatzel et al., 2002). CCR5-Expression ist assoziiert mit einer TH1-Differenzierung von T-Zellen (Loetscher et al., 1998). Dies steht im Einklang mit der vermehrten Produktion von TH1-Zytokinen wie z.B. dem IFN- γ durch V δ 2-T-Zellen. Außerdem exprimieren die V δ 2-T-Zellen verstärkt den Chemokin-Rezeptor CXCR3, dessen Ligand IP-10 ist. Beide Rezeptoren lassen sich durch direkte Stimulation mit T-Zellrezeptor-Liganden wie Phosphoantigen oder indirekt über Makrophagen durch *Mycobacterium tuberculosis*-Antigene in ihrer Expression herunterregulieren.

V δ 1-T-Zellen exprimieren im Vergleich zu V δ 2-T-Zellen eine höhere Anzahl an CXCR1, dessen Ligand IL-8 ist (Glatzel et al., 2002).

1.3 Toll-like Rezeptoren (TLR)

1.3.1 TLR-Expression und Funktion

Die Toll-like Rezeptoren (TLR) sind Transmembranproteine mit intrazellulärer Domäne. Sie gehören zur Gruppe der „Pattern Recognition Receptors“ (PRR), also Mustererkennungsrezeptoren und binden „Pathogen associated molecular Patterns“ (PAMPs), d.h. molekulare Wiederholungsmuster, wie Kohlenhydrat- oder Lipidgruppen oder Desoxy-/Ribonukleinsäuren (DNA/RNA), die für mikrobielle Oberflächen oder Viren charakteristisch sind.

Sie sind hauptsächlich Rezeptoren der angeborenen Immunität und dienen damit der ersten Erkennung von Fremdan antigenen. Sie werden jedoch außer von Granulozyten, APZ wie Makrophagen und dendritischen Zellen, Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen), Epithel- und Endothelzellen und Fibroblasten auch von den T-Zellen exprimiert (Kabelitz, 2007, Kulkarni et al., 2010, Chang, 2010).

Beim Menschen sind bisher 10 verschiedene TLR bekannt, von denen jeder spezielle Liganden erkennt (s. auch Tabelle 1), deren Bindung über eine Signalkaskade u.a. den Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert, der daraufhin in den Zellkern wandert und die Genexpression von Zytokinen, Chemokinen und kostimulatorischen Molekülen beeinflusst (Takeda et al., 2003, Kawai u. Akira, 2010). Die Toll-like Rezeptoren unterscheiden sich in ihrer Lokalisation (s. Abb.1): TLR, die hauptsächlich virale Bestandteile wie DNA/RNA erkennen, nämlich TLR 3, 7, 8 und 9, liegen in intrazellulären Kompartimenten vor, da ihre physiologischen Liganden intrazellulär entstehen. Ihre künstlichen Liganden müssen internalisiert, d.h. aktiv durch die Zellmembran transportiert werden. TLR, die bakterielle Komponenten erkennen (TLR1, 2, 4, 5, 6), werden auf der Zelloberfläche exprimiert (Kawai u. Akira, 2010).

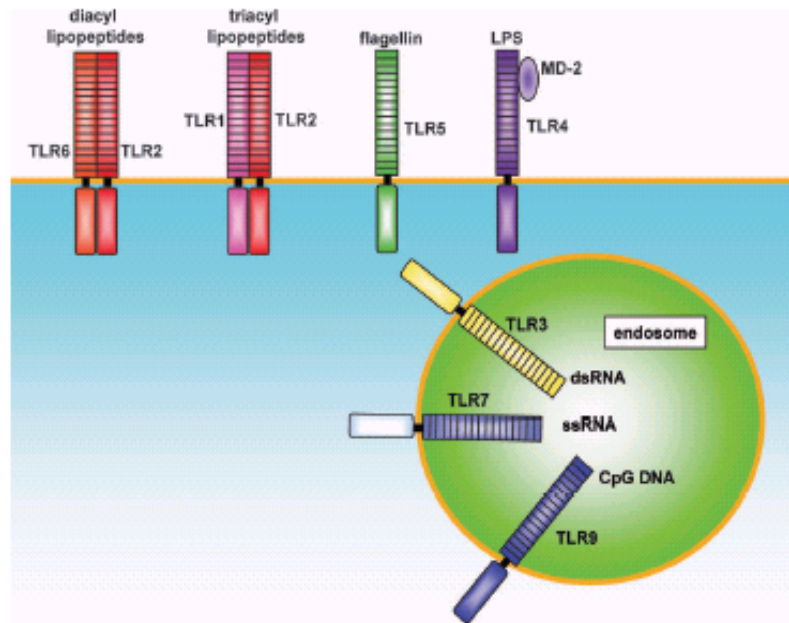


Abbildung 1: TLR mit ihren Liganden und deren Lokalisation in der Zelle (Takeda K, Akira S, 2005: Toll-like receptors in innate immunity).

Tabelle 1: Übersicht über die Toll-like Rezeptoren, die Zellen, die sie exprimieren und ihre Liganden (Chang, 2010).

TLR	Liganden	Exprimierende Zellen
TLR1/2	Peptidoglykane, Glykolipide und Lipopeptide wie z.B. triacylierte Lipoproteine (Pam ₃ CSK4)	B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, dendritische Zellen, T-Zellen, Endothelzellen, Epitheliale Zellen, Keratinozyten, Tumorzellen
TLR2/6	Peptidoglykane, Glykolipide und Lipopeptide wie z.B. diacylierte Lipoproteine (Pam ₂ CSK4)	Zellen in Milz, im Herzen, im Gehirn, in der Muskulatur, T-Zellen, B-Zellen, myeloide Zellen, Endothelzellen, Epitheliale Zellen, Keratinozyten, Tumorzellen
TLR3	virale doppelsträngige RNA, Polyinosin-Polycytidyl-Säure (Poly(I:C))	Myeloide dendritische Zellen, NK-Zellen, Fibroblasten, Darmepithelzellen, T-Zellen, Endothelzellen, Epitheliale Zellen, Keratinozyten, Neurone, Tumorzellen

TLR	Liganden	Exprimierende Zellen
TLR4	Lipopolysacharid (LPS), Hitzeschockproteine, respiratorischer Syncytialvirus-Faktor (RSV F), Taxol	periphere Leukozyten, NK-Zellen, myeloide Zellen, Mastzellen, Zellen in Herz und Plazenta, Endothelzellen, Epitheliale Zellen, Keratinocyten, Tumorzellen
TLR5	Flagellin	Monozyten, dendritische Zellen, Epithelzellen im Ovar, in der Prostata, in den Testes, T-Zellen, Endothelzellen, epitheliale Zellen, Keratinocyten, Tumorzellen
TLR6	diacylierte Lipoproteine wie FSL-1 und Pam ₂ CSK4	Zellen von Thymus, Milz, Ovar und Lunge, T-Zellen, B-Zellen, myeloide Zellen, Endothelzellen, epitheliale Zellen, Keratinocyten, Tumorzellen
TLR7	einzelsträngige virale RNA, Imidazoquinolin	Dendritische Zellen, Monozyten/Makrophagen, NK-Zellen, T- u. B-Zellen, Tumorzellen, Endothelzellen
TLR8	einzelsträngige virale RNA, Imidazoquinolin	Dendritische Zellen, Monozyten/Makrophagen, NK-Zellen, Tumorzellen, Endothelzellen
TLR9	bakterielle unmethylierte CpG DNA	Plasmacytoide dendritische Zellen, T- und B- Zellen, NK-Zellen, Endothelzellen, epitheliale Zellen, Keratinocyten, Tumorzellen
TLR10	(unbekannt)	Zellen in lymphatischen Organen wie Tonsillen und Lymphknoten, B-Zellen, T- Zellen, myeloide Zellen, Endothelzellen, epitheliale Zellen

1.3.2 TLR-Expression auf T-Zellen und weitere Funktionen

Bei der Untersuchung von T-Zellen fanden Hornung und Zarembek unabhängig voneinander Expression von TLR1-9-mRNA, wobei Unterschiede in der Expressionsstärke der einzelnen TLR bei verschiedenen T-Zellpopulationen beschrieben sind (Hornung et al., 2002, Zarembek et al., 2002). Zarembek beschreibt

außerdem einen Einfluss von PAMPs und Zytokinen auf die Stärke der TLR-Expression (Zarembet et al., 2002). Ferner exprimieren verschiedene Subpopulationen von $\alpha\beta$ -T-Zellen unterschiedliche TLR (Kabelitz, 2007). Die Expression der TLR auf T-Zellen hängt auch vom Aktivierungszustand der Zelle ab. Naive T-Zellen exprimieren meist weniger TLR als aktivierte T-Zellen bzw. Gedächtniszellen (Wesch et al 2006, Oberg et al, 2010).

Im Gegensatz zu $\alpha\beta$ -T-Zellen werden in $\gamma\delta$ -T-Zellen des Blutes von Rindern TLR3- und TLR9-mRNA besonders stark exprimiert (Hedges et al., 2005). Hedges und Kollegen beschreiben außerdem die Hochregulation von TLR-mRNA und der mRNA anderer Rezeptoren der angeborenen Immunität in $\gamma\delta$ -T-Zellen nach Stimulation mit dem TLR-Liganden LPS. Eine verstärkte TLR3-mRNA-Expression (jedoch nicht von TLR9-mRNA) konnte auch in humanen $\gamma\delta$ -T-Zellen im Unterschied zu $\alpha\beta$ -T-Zellen nachgewiesen werden (Wesch et al., 2006). In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass TZR-aktivierte humane $\gamma\delta$ -T-Zellen deutlich mehr IFN- γ nach zusätzlicher Stimulation mit dem TLR3-Liganden Poly(I:C) produzieren im Vergleich zu einer alleinigen TZR-Stimulation. Ferner wird nach Kostimulation mit TZR+TLR3-Liganden TLR3 auf der Oberfläche von $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimiert (Wesch et al., 2006). TLR3 ist wie TLR7, 8 und 9 intrazellulär lokalisiert (Kawai u. Akira, 2010). In einigen Epithelzellen des respiratorischen Traktes konnte TLR3 nach Infektion mit bestimmten Viren auch auf der Oberfläche detektiert werden (Großkreutz et al., 2006, Hewson et al., 2005). Nukleinsäure-Liganden werden meist von den intrazellulär lokalisierten TLR erkannt, da Viren in der Zelle replizieren.

Die synthetischen TLR7- bzw. -8-Liganden Imiquimod und Resiquimod werden therapeutisch gegen Infektionen mit humanen Papillomaviren oder gegen maligne Hauttumore bzw. deren Vorstufen lokal appliziert eingesetzt. Die TLR7/8-Liganden lösen vermutlich über eine gesteigerte Zytokinproduktion verschiedener Abwehrzellen eine Entzündungsreaktion aus. Es werden beispielsweise dendritische Zellen zur Migration, zur Expression von kostimulatorischen Molekülen (Smits et al., 2008) und zur Bildung von IFN- α (Gorden et al., 2005) angeregt. Auch die zytotoxischen Fähigkeiten der APZ werden gefördert (Smits et al., 2008) und die Aktivierung von T-Helfer-Zellen und ZTL zur Bekämpfung der virusinfizierten bzw. Tumorzellen wird beschleunigt. *In vitro* konnte Imiquimod bei einigen Tumorzellen direkt die Apoptose induzieren (Smits et al., 2008). Bei einem Teil der Tumorzellen, bei welchen Imiquimod keine Apoptose auslöste, konnte die durch $\gamma\delta$ -T-Zellen

induzierte Tumorzelllyse durch Behandlung der Tumorzellen mit Imiquimod *in vitro* verstärkt werden (Shojaei et al., 2009).

Bei der Stimulation humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) mit TLR7- oder TLR8-Liganden kommt es zu einer vermehrten Produktion der Zytokine IFN- α , TNF- α und IL-12, wobei IFN- α hauptsächlich durch dendritische Zellen und TNF- α durch Monozyten produziert werden (Gorden et al., 2005). Auch in CD4⁺ T-Zellen, besonders bei „effector memory“-Zellen, induziert die Stimulation mit TLR7/8-Liganden eine IFN- γ -Ausschüttung (Caron et al., 2005). Caron und Kollegen beschreiben ebenfalls eine verstärkte IFN- γ -Produktion von CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit dem TLR2-Liganden Pam₃CSK4 und dem TLR5-Liganden Flagellin. Bei den genannten TLR7/8-, -2- und -5-Liganden konnte die IFN- γ -Produktion durch eine zusätzliche Stimulation mit monoklonalen Antikörpern (mAb) gegen CD2, gegen CD3 oder durch Zugabe von IL-2 noch gesteigert werden. Diese TLR-Ligand induzierte Kostimulation der CD4⁺ T-Zellen löste zudem eine verstärkte Proliferation und die erhöhte Produktion weiterer Zytokine wie IL-2, IL-8 und IL-10 aus (Caron et al., 2005). Auch Biswas et al. (2009) konnten TLR2 auf der Oberfläche von CD4⁺ T-Zellen aus Mäusen nachweisen, nachdem diese Zellen mit einem Shigellen-Protein und anti-CD3-mAb stimuliert worden waren. In derselben Arbeit konnte die TLR2-Expression auf der Oberfläche von CD4⁺ T-Zellen durch die TLR2-Liganden Pam₃Cys4 und FSL-1 und anti-CD3-mAb noch gesteigert werden. Kulkarni et al. (2010) vermuten daher, dass CD4⁺ T-Zellen TLR2 nicht konstitutiv exprimieren, aber die Expression nach Stimulation hochregulieren.

Bei dem TLR5-Liganden Flagellin handelt es sich um einen Hauptbestandteil der Geißel von Bakterien. Er wird in großen Mengen von begeißelten Bakterien wie den Spirochäten gebildet. Zu den Spirochäten gehören z.B. Borrelien (*Borrelia burgdorferi*), die durch Zecken übertragen werden und die Lyme-Borreliose auslösen können (Singh u. Girschick, 2006). Besonders bei Infektionen des Darmes, z.B. mit *Salmonella typhimurium*, werden CD4⁺ T-Zellen durch Flagellin aktiviert. Bei der Aktivierung von naiven CD4⁺ T-Zellen kommt es zu einer klonalen Expansion und Induktion von IFN- γ -Produktion (McSorley et al., 2002), was auch eine Rolle bei der Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen spielen kann (Lodes et al., 2004).

TLR2 erkennt unter anderem Peptidoglykane und kann sowohl bei Mäusen (Farhat et al., 2008) als auch beim Menschen (Oberg et al., 2010) einen Heterodimer mit

TLR1 oder mit TLR6 bilden, wodurch das Spektrum von mikrobiellen Liganden erweitert wird. Komai-Koma und Kollegen konnten TLR2 bei naiven $CD4^+$ T-Zellen auf mRNA-Ebene und als Protein intrazellulär nachweisen. Nach Aktivierung wurde TLR2 auf der Oberfläche von $CD4^+$ T-Zellen exprimiert. Die Aktivierung naiver T-Zellen erfolgte durch anti-TZR-mAb und $IFN-\alpha$. Nach Stimulation der T-Zellen mit dem synthetischen TLR1/2-Liganden Pam₃CSK4 und anti-CD3-mAb kam es neben der verstärkten TLR2-Expression zu vermehrter Proliferation und Freisetzung von $IFN-\gamma$, IL-2 und $TNF-\alpha$. TLR2/4-Stimulation mit dem Liganden LPS konnte keine Veränderungen in der Zytokin-Produktion bewirken (Komai-Koma et al., 2004). Deetz et al. (2006) konnten neben der TLR1-10-mRNA auch TLR2 als Protein auf der Oberfläche von anti-CD2-mAb stimulierten humanen $\gamma\delta$ -T-Zellen nachweisen. Die TZR-TLR2-Stimulation mit Pam₃Cys bewirkte eine verstärkte $IFN-\gamma$ -Produktion und Expansion der $\gamma\delta$ -T-Zellen (Deetz et al., 2006). Mokuno und Kollegen (2000), die $\gamma\delta$ -T-Zellen aus dem Peritoneum von Mäusen mit LPS stimulierten, konnten einen Anstieg der TLR2-, nicht aber der TLR4-Expression beobachten. Im Gegensatz dazu zeigten Cui et al. (2009), dass humane $\gamma\delta$ -T-Zellen nach Lipid A-Stimulation sowohl die TLR2- als auch die TLR4-Oberflächenexpression steigern. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die TLR-Kostimulation zusätzlich zur TZR-Stimulation bei $CD4^+$ T-Zellen eine Proliferation, ein verlängertes Überleben und die Induktion von B-Zellaktivität bewirkt (Kulkarni et al., 2010). Bei $\gamma\delta$ -T-Zellen ist bislang die Verstärkung ihrer Effektorfunktionen nach TLR2-Liganden- bzw. TLR3-Liganden-Stimulation beschrieben (Deetz et al., 2006, Wesch et al., 2006).

1.4 Caspasen und Zelltod

Caspasen sind Enzyme, die am programmierten Zelltod, der Apoptose, beteiligt sind. Sie sind intrazellulär vorliegende Proteasen mit der Aminosäure Cystein im aktiven Zentrum und spalten Peptidbindungen C-terminal von Aspartat. Daher der Name aus dem Englischen für „**C**ysteiny**A**spartate **S**pecific **P**rote**A**SE“. In humanen Zellen sind zehn verschiedene Caspasen identifiziert worden, die anhand der Aminosäuresequenzen ihrer Substrate in drei Gruppen eingeteilt werden können (Garcia-Calvo et al., 1999): Die erste Gruppe besteht mit den Caspasen 1, 4 und 5 aus den inflammatorischen Caspasen, die eine Rolle bei Entzündungsprozessen und

der Bildung von inflammatorischen Zytokinen spielen (Thornberry et al., 1992). Die zweite Gruppe bilden die Effektorcaspasen (Caspase 3, 6 und 7), die an der Apoptose, also am geordneten Abbau von Zellen beteiligt sind. Dazu gehört das Schneiden von zellulären Bestandteilen wie der Kernmembran oder Proteinen zur Regulation des Zytoskeletts. Außerdem inaktivieren diese Caspasen Proteine, die an DNA-Reparatur und/oder -Replikation und an der Proteinbiosynthese beteiligt sind. Caspasen zerstören die DNA und die Kernstruktur und bringen die Zelle zur Expression von Signalen zur Phagozytose. Die dritte Gruppe mit den Caspasen 2, 8, 9 und 10 beinhaltet die Initiatorcaspasen, welche die Effektorcaspasen aktivieren können. Alle Caspasen werden als inaktive Vorstufen gebildet und können durch Autokatalyse oder spezifische Enzyme aktiviert werden. Dabei wird eine Untereinheit abgespalten, wodurch eine Domäne frei wird, die sich als Heterodimer mit einer anderen zu einem aktiven Komplex zusammenlagert. Zwei Heterodimere lagern sich zu einem Tetramer zusammen und bilden das aktive Enzym. Verschiedene Faktoren können die Kaskade der Apoptose in Gang setzen (Thornberry et al., 1998). Die Aktivierung von Todesrezeptoren (Fas-Liganden) oder zytotoxische Substanzen können die Initiatorcaspasen aktivieren, die wiederum die Effektorcaspasen in ihre aktive Form versetzen. Auch die Bindung von Kofaktoren, die durch proapoptotische Signale gefördert wird, kann Caspasen aktivieren. Neuere Forschungsergebnisse beschreiben, dass die Aktivierung von inflammatorischen Caspasen im Inflammasom, einem intrazellulären Proteinkomplex stattfindet, der durch verschiedene endogene und äußere Stimuli induziert wird (Yazdi et al., 2010). Die Aktivierung von T-Zellen induziert über Signalkaskaden unter anderem die aktive Form von Caspase 3 und führt damit zur Apoptose (Budd, 2001).

2. Fragestellung

$\gamma\delta$ -T-Zellen dienen im Immunsystem als Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Abwehr. Ihre Funktionen sind aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften und der insgesamt geringen Anzahl beim Menschen noch nicht genau entschlüsselt. Auch die Bedeutung der einzelnen Subpopulationen ist noch nicht vollständig geklärt.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung von aus humanem Blut gewonnenen $\gamma\delta$ -T-Zellen. Folgende Fragen lagen der vorliegenden Doktorarbeit zu Grunde:

1. Welche Toll-like Rezeptoren werden von frisch isolierten $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimiert?
2. Gibt es Unterschiede in der Expression von TLR zwischen der V δ 1- und der V δ 2-Subpopulation?
3. Wirken TLR-Liganden direkt stimulierend auf $\gamma\delta$ -T-Zellen oder kostimulierend nach einer zusätzlichen TZR-Stimulation? Werden unterschiedliche $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulationen durch TLR-Liganden gleichermaßen aktiviert?
4. Welche Zytokine/Chemokine werden nach TLR-Stimulation bzw. nach einer kombinierten TZR/TLR-Stimulation von einzelnen $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulationen produziert?
5. Wird durch TLR-Stimulation der $\gamma\delta$ -T-Zellen Zelltod ausgelöst?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Buffy coats (Leukozytenkonzentrate):

Sie stammen aus Vollblut von gesunden Spendern (jeweils ca. 500 ml), aus welchem das Plasma und die Erythrozyten schon größtenteils entnommen wurden, so dass ein Leukozytenkonzentrat von ca. 50 ml übrig bleibt.

Vielen Dank an die Transfusionsmedizin des UK-SH, die die Buffy coats für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt hat!

3.1.2 Lösungen, Puffer und Zusätze:

- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), Cell Concepts GmbH, Umkirch
- Biocoll Separating Solution, Biochrom AG, Berlin
- MACS-Puffer: PBS + 0,5% BSA + 2mM EDTA
- Dyal-Puffer: PBS + 0,1% BSA + 2mM EDTA
- FACS Lysing Solution für Vollblut nach Immunfluoreszenzfärbung (Einsatz 1:10), BD Biosciences, Heidelberg
- Waschpuffer für Oberflächenfärbung: 500 ml PBS + 1% BSA + 0,1% NaN₃

3.1.3 Medium:

X-VIVO, Lonza, Schweiz

3.1.4 Material für MACS (Magnetic Cell Sorting zur Isolierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen)

Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach:

FcR Blocking Reagent, human

Anti-TZR $\gamma\delta$ Micro Bead Kit, human (TZR $\gamma\delta$ Hapten Antibody, human,
Anti-Hapten FITC Micro Beads)

MACS Separation Column: LS Column

MACS Pre-Separation Filter

3.1.5 Antikörper:

3.1.5.1 Isotypkontrollen

Antikörper	Klon	Konjugat	Spezies	Firma
Anti-Maus-IgG1	X40	-FITC	Maus-IgG1	BD Biosciences
Anti-Maus-IgG1	X40	-PE	Maus-IgG1	BD Biosciences
Anti-Maus-IgG2a	X30	-FITC	Maus-IgG2a	BD Biosciences
Anti-Maus-IgG2a	X30	-PE	Maus-IgG2a	BD Biosciences

Konjugate/ Fluoreszenzfarbstoffe:

FITC: Fluoreszenzisothiozyanat

PE: Phytoerythrin

APC: Allophycocyanin

3.1.5.2 Monoklonale Leukozytenantikörper

Antikörper	Klon	Konjugat	Spezies	Firma
Anti-human CD3	SK7	-PE	Maus-IgG1	BD Biosciences
Anti-human TZR pan $\gamma\delta$	11F2	-FITC -APC -PE	Maus-IgG1	BD Biosciences, Endogen, USA
Anti-human V δ 1	TS8.2	-FITC	Maus-IgG1	Endogen, Thermo Scientific, Dreieich
Anti-human V δ 2	Immu389 B6	-FITC -PE	Maus-IgG1	Beckman Coulter, Krefeld, BD Biosciences
Anti-human CD14	MpP9	-APC	Maus-IgG2b	BD Biosciences
Anti-human CD304	AD5-17F6	-APC	Maus-IgG1	Miltenyi Biotec GmbH

3.1.5.3 Monoklonale TLR-Antikörper

a) für Oberflächenmarkierung:

Antikörper	Klon	Konjugat	Spezies	Firma
Anti-TLR1	GD2.F4	-PE	Maus-IgG1	eBiosciences, Österreich
Anti-TLR2	TL2.1	-APC	Maus-IgG2a	eBiosciences
Anti-TLR3	TLR3.7	-PE	Maus-IgG1	eBiosciences
Anti-TLR4	HTA125	(Unkonjugiert)	Maus-IgG2a	eBiosciences

b) für intrazelluläre Färbungen:

Antikörper	Klon	Konjugat	Spezies	Firma
Anti-TLR3	TLR3.7	-PE	Maus-IgG1	eBiosciences
Anti-TLR6	86B1153.2	(unkonjugiert)	Maus-IgG1	Alexis/Axxora, Grünberg
Anti-TLR8	44C143	-PE	Maus-IgG1	Alexis/Axxora

Die unkonjugierten anti-TLR4-Antikörper wurden in einem zweiten Färbeschritt mit einem PE-konjugierten Ziege-anti-Maus-Ig markiert.

Der unkonjugierte anti-TLR6-Antikörper wurde mit Alexa Fluor 647 mAb Labelling Kit, Invitrogen, Karlsruhe, nach Hersteller-Anweisung markiert.

3.1.6 Kit für intrazelluläre Färbungen:

BD Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilisation Kit, BD Biosciences

3.1.7 TLR-Liganden/-Agonisten:

- TLR1/2:** Pam₃CSK4 (synthetisches triacyliertes Lipoprotein), InvivoGen, Frankreich
- TLR2(6):** Pam₂CSK4 (synthetisches diacyliertes Lipoprotein), InvivoGen
- TLR2/6:** FSL-1 (synthetisches diacyliertes Lipoprotein), InvivoGen
- TLR3:** Poly(I:C), Calbiochem, Merck, Darmstadt
- TLR5:** Flagellin von *Salmonella typhimurium* (FLA-ST) (Gram-neg.) und *Bacillus subtilis* (FLA-BS) (Gram-pos.), InvivoGen
- TLR7:** Imiquimod (Bestandteil von Imidazoquinolin, Guanosin-Analogon), InvivoGen
- TLR8:** Einzelstrang-RNA:
ssPoly(U) (Uridin) (RNA Homopolymer, LyoVec™),
ssRNA 40 (aus HIV-1 gewonnene RNA, LyoVec™, enthält GU-reiche
(Guanosin, Uridin) Sequenzen), InvivoGen
LyoVec™ ist ein kationisches Lipid, das im Komplex mit der RNA
vorliegt, um sie vor Abbau zu schützen und ihre Aufnahme in
die Zelle zu erleichtern.

3.1.8 Kit für Cytokine Bead Array (CBA):

Human TNF Flex Set, BD Biosciences

3.1.9 Kit für ELISA:

DuoSet ELISA für humanes IFN-γ, R&D Systems, Wiesbaden

3.1.10 Kit für Caspase-Glo 3/7 Assay:

Promega , Mannheim

3.1.11 Verbrauchsmaterialien:

Zellkulturflaschen, 250ml	Greiner, Frickenhausen
Falcon-Röhrchen 2054	BD Biosciences, Heidelberg
Cellstar Tubes	Greiner, Frickenhausen
Pasteurpipetten un-/gestopft	Assistent, Sondheim
Pipetten (5 ml; 10 ml; 25 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Färbeplatten 96-well (Spitzboden)	NerbePlus, Winsen/Luhe
Färbeplatten 96-well (Flach-/Rundboden)	Nunc, Wiesbaden

3.2 Methoden

3.2.1 Spenderauswahl:

Zur Identifizierung eines passenden Spenders wurden jeweils Immunfluoreszenzfärbungen (s. 3.2.9) von jeweils 20 µl Spenderblut aus Buffy coats durchgeführt. Dabei wurde der Anteil von $\gamma\delta$ -T-Zellen, V δ 1-T-Zellen und V δ 2-T-Zellen innerhalb der Leukozyten bestimmt.

Um zu gewährleisten, dass nach der Aufbereitung eine für die Stimulation genügend große Menge an Zellen vorhanden war, sollte ein Spender einen Anteil von $\geq 3\%$ $\gamma\delta$ -T-Zellen aufweisen.

3.2.2 Gewinnung von peripheren mononukleären Zellen (PBMZ):

Lymphozyten und Monozyten (entsprechen PBMZ) wurden aus Buffy coats mittels Ficoll-Hypaque Dichtegradienten-Zentrifugation wie folgt isoliert:

Die einzelnen Buffy coats wurden jeweils etwa 1:2 mit PBS in Zellkulturflaschen verdünnt. Je 15ml Ficoll-Lösung wurde mit je ca. 35ml Zellsuspension in 50ml-Röhrchen überschichtet und für 20 Minuten (Min.) bei 2000 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Dabei sammelten sich die PBMZ entsprechend ihrer spezifischen Dichte als Ring zwischen Überstand (Plasma/Thrombozyten) und der Ficoll-Lösung an, während andere Zellpopulationen mit höherer Dichte (Erythrozyten/Granulozyten) auf den Boden des Röhrchens absanken. Die PBMZ wurden eingesammelt, drei Mal mit je 50ml PBS gewaschen (1x bei 1600rpm, 5 Min. und 2x bei 1000rpm, 10 Min.) und anschließend in X-VIVO überführt.

3.2.3 Bestimmung der Zellzahl und –vitalität:

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 25µl der 1:10 mit X-VIVO verdünnten Zellsuspension mit 75µl Eosin resuspendiert und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Es wurden nur die ungefärbten Zellen gezählt, da diese intakt waren und das Eosin nicht durch die Membran eindringen konnte. Die Zellkonzentration ergaben sich aus der Multiplikation von Zellzahl, Verdünnungsfaktor und Kammerfaktor (10^4).

3.2.4 Isolierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen durch „Magnetic Activated Cell Sorting“ (MACS):

Bei dieser Methode werden die gewünschten Zellen mit spezifischen, gegen den $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor gerichteten Antikörpern markiert, die mit magnetischen Partikeln gekoppelt sind, so dass sie bei der anschließenden Separation mit Hilfe einer magnetischen Säule an dieser haften bleiben (Positive Selektion). Der Durchfluss der Säule enthält die unmarkierten Zellen (Negative Selektion).

Im ersten Schritt wurden die Fc-Rezeptoren nicht gewünschter Zellen (z.B. Monozyten und Makrophagen) mit einer speziellen Blocking-Reagenz blockiert. Dies verhindert die unspezifische Bindung verwendeter Antikörper an Fc-Rezeptoren und somit eine Zellkontamination. Die vorher in 20ml Puffer gewaschenen PBMZ wurden in 6,7 μ l MACS-Puffer pro 1×10^6 Zellen gelöst. 1,3 μ l Blocking-Reagenz auf 1×10^6 Zellen wurden hinzugefügt und die Suspension für 15 Min. bei 4° C inkubiert.

Zur Markierung des $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptors wurden nach einem Waschschrift (20ml MACS-Puffer, 2000 rpm für 5 Min.) 4,3 μ l MACS-Puffer und 0,7 μ l anti-TZR $\gamma\delta$ -Hapten Antikörper auf jeweils 1×10^6 Zellen zu den PBMZ hinzugegeben und für 10 Min. bei 4° C inkubiert.

Nach einem weiteren Waschen wurden 3,7 μ l MACS-Puffer und 1,3 μ l anti-Hapten-Mikromagnetpartikel (FITC-konjugiert) jeweils pro 1×10^6 Zellen hinzugegeben, um die $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor-gebundenen Antikörper magnetisch und farblich zu markieren. Die Zellen wurden nach 15 Min. Inkubation bei 4° C erneut gewaschen und dann in 5 μ l MACS-Puffer pro 1×10^6 Zellen resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann durch einen Pre-Separationsfilter und anschließend durch die mit 3ml MACS-Puffer vorgespülte, im Magnetfeld befindliche LS-Säule gegeben. Die Säule wurde mit 2x 2ml MACS-Puffer gespült, aus dem Magnetfeld entfernt und die an der Säule haftenden $\gamma\delta$ -T-Zellen mit 5ml des bisher verwendeten Puffers eluiert.

Im Anschluss erfolgte eine Bestimmung der Zellzahl der gewonnen $\gamma\delta$ -T-Zellen (s. 3.2.3) und eine Überprüfung deren Reinheit am Durchflusszytometer. Die Reinheit der $\gamma\delta$ -T-Zellen betrug >98%.

3.2.5 Trennung der $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulationen in V δ 2- und nicht-V δ 2- $\gamma\delta$ -T-Zellen mit Hilfe eines Sorters (FACS Aria)

Der Sorter ist ein Durchflusszytometer, der unterschiedliche Zellen anhand von Größe, Granularität und Fluoreszenzintensität erkennt. Zusätzlich ist es mit dem Sorter möglich, gewünschte Zellpopulationen zu trennen.

Zur Trennung der V δ 2-T-Zellen von nicht-V δ 2-T-Zellen (meist V δ 1) wurden die anti-TZR $\gamma\delta$ -FITC markierten Zellen mit einem spezifischen PE-konjugierten anti-V δ 2-Antikörper gefärbt. Hierbei wurden 1×10^6 $\gamma\delta$ -T-Zellen in 15 μ l MACS-Puffer resuspendiert und 1,5 μ l Antikörper pro 1×10^6 Zellen dazugegeben. Zum Ausschluss von Monozyten wurden die Zellen zusätzlich mit 5 μ l eines APC-markierten anti-CD14-Antikörpers gefärbt. Um dendritische Zellen auszuschließen wurden 5 μ l eines ebenfalls APC-markierten anti-CD304-Antikörpers dazugegeben. Bei einigen Experimenten wurde außerdem mit einem FITC-markierten anti-V δ 1-Antikörper (2 μ l pro 1×10^6 Zellen) gefärbt, um die Gleichheit in der Behandlung der Subpopulationen zu gewährleisten.

Die Zellen wurden mit dem Antikörper für 30 Min. bei 4° C inkubiert und anschließend mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen.

Zur Zellsortierung wurden die Zellen in 2,5 ml Dynal-Puffer aufgenommen und vorher noch einmal gefiltert.

Für die Durchführung des Sortierens danke ich herzlich Sandra Ussat, Jan Lenke und Hans-Heinrich Oberg!

3.2.6 Stimulation der Subpopulationen mit verschiedenen Toll-like Rezeptor-Liganden:

Zur Stimulation der V δ 1- bzw. der V δ 2- $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden Rundbodenplatten mit jeweils 96 Kavitäten verwendet. Die Hälfte der Kavitäten wurde mit einem Kaninchen-anti-Maus-Antikörper beschichtet, der in einer Endkonzentration von 1 μ g/ml für zwei bis drei Stunden bei 37° C inkubiert wurde. Der Kaninchen-anti-Maus-Antikörper dient der Kreuzvernetzung der TZR, die mit einem von Mäusen stammenden anti-TZR pan $\gamma\delta$ monoklonalen Antikörper (mAK) markiert sind. Die Kreuzvernetzung bewirkt einen besonders starken TZR-Stimulus und aktiviert die $\gamma\delta$ -T-Zellen. Nach drei Waschschritten wurden in jede Kavität 250.000 Zellen in je 200 μ l Medium ausgesät, welches z.T. mit den einzelnen Liganden versetzt war.

Als Negativkontrolle wurden Zellen ohne weiteren Stimulus in X-VIVO Medium belassen.

Als Positivkontrolle diente die Stimulation des TLR3 mit Poly(I:C) in einer Endkonzentration von 50 μ l/ml.

Pam₃CSK4 diene zur Stimulation von TLR1 und 2 und Pam₂CSK4 bzw. FSL-1 als TLR 2 (und 6)- Ligand. Diese Liganden wurden austitriert (5ng – 5µg), wobei eine Endkonzentration von 1µg/ml sich als optimale Einsatzkonzentration erwies.

Da die TLR 1, 2 und 6 individuell verschieden exprimiert werden, wurden die Zellen z.T. auch mit einer Mischung der Liganden Pam₂CSK4 (1µg/ml), Pam₃CSK4 (1µg/ml) und FSL-1 (1µg/ml) als typische TLR2-Liganden stimuliert, um interindividuelle Unterschiede in der funktionellen Expression von TLR1/2 und TLR2/6 Heterodimeren zu kompensieren.

Zur Stimulation des TLR 5 wurden in einigen Experimenten zwei Sorten von Flagellin verwendet. Zum einen das Flagellin des Bakteriums *Salmonella typhimurium* und zum anderen das des *Bacillus subtilis*. Auch hier wurde zur Ermittlung der optimalen Einsatzkonzentration von 1ng bis 1µg/ml titriert. Die optimale Konzentration betrug 1µg/ml.

Außerdem wurde Imiquimod in Konzentrationen zwischen 0,1 und 100µg pro ml verwendet, um TLR7 zu stimulieren, wobei nur die höchste Konzentration (100 µg/ml) zu einer Reaktion führte.

Zur Stimulation des TLR 8 wurden die Zellen mit Einzelstrang-RNA inkubiert, mit ss Poly U in Konzentrationen zwischen 0,1 und 10µg/ml und ssRNA 40 in einer Konzentration von 10µg/ml.

Um die Reaktivität der Vδ1- und Vδ2-T-Zellen zu fördern, wurden einige Kulturen mit Interleukin-2 versetzt, welches von γδ-T-Zellen nur in geringen Mengen produziert werden kann. Die Einsatzkonzentration von IL-2 waren 25U/ml.

Alle Ansätze mit γδ-T-Zellen wurden für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Überstände abgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Zellen wurden für folgende Auswertungen sofort verarbeitet.

3.2.7 Cytometric Bead Array (CBA):

Diese Methode dient der simultanen und quantitativen Bestimmung von löslichen Mediatoren, in unserem Falle von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen in den gesammelten Überständen der stimulierten γδ-T-Zellen.

Es werden dabei Micro-Beads verwendet, die sich anhand verschiedener Rottöne unterscheiden lassen und an deren Oberfläche für die Mediatoren spezifische Antikörper gebunden sind. Wenn man diese Kugeln zu den aufgetauten Überständen

gegeben hat, binden die Antikörper die vorhandenen Proteine. In einem zweiten Schritt werden freie, fluoreszenzmarkierte, ebenfalls spezifische Antikörper hinzugegeben, die sich an der freien Seite der gebundenen Mediatoren anlagern. Diese Komplexe können dann qualitativ und quantitativ mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse bestimmt werden.

Die Überstände wurden auf folgende Zytokine bzw. Chemokine untersucht:

- Interferon- γ (IFN- γ)
- Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)
- Granulozyten- und Monozytenkoloniestimulierender Faktor (GM-CSF)
- Interleukin-6 (IL-6)
- Interleukin-1 β (IL-1 β)
- Interferon induziertes Protein-10 (IP-10)
- Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted (reguliert auf Aktivierung hin, durch normale T-Zellen exprimiert und sezerniert) (RANTES)
- Makrophagen induziertes Protein-1 α (MIP-1 α)
- Makrophagen induziertes Protein-1 β (MIP-1 β)
- Interleukin-8 (IL-8)
- Macrophage- Chemoattractor-protein- 1 (Makrophagen anziehendes Protein) (MCP-1)
- Interleukin-12 (IL-12)

3.2.8 IFN- γ -ELISA:

Der ELISA (Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay / Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest) dient ebenfalls dem quantitativen Nachweis eines bestimmten Proteins mit Hilfe von spezifischen Antikörpern.

Dazu wird eine Flachbodenplatte mit 96 Kavitäten gemäß Versuchsanleitung mit einem „capture“-Antikörper (Maus anti-humanes IFN- γ) beschichtet, der das gesuchte Protein aus den dazugegebenen Überständen in einer Inkubationszeit von zwei Stunden abfängt und festhält. Nach einem Waschschrift wird ein Detektionsantikörper (Ziege anti-humanes IFN- γ) in die Kavitäten gegeben, der in zwei weiteren Stunden an das Protein bindet. An diesem Antikörper liegt Biotin gebunden vor. Daran wird nach einem weiteren Waschschrift in 20 Minuten Inkubationszeit Streptavidin, verbunden mit Meerrettich-Peroxidase, gebunden. Dieses Enzym setzt das im folgenden Schritt zugegebene Substrat innerhalb von 20

Min. zu einer blauen Substanz um, die nach Zugabe von H_2SO_4 gelb wird. Die Intensität der gelben Farbe im Vergleich zum Standard wird mit Hilfe eines Fluoreszenzmessgerätes (hier TECAN Reader und ELISA Sunrise, beide d. Fa. TECAN, Schweiz) bestimmt und gibt damit eine Aussage über die Mengen des gesuchten Proteins in den verschiedenen Überständen.

In dieser Arbeit wurde die ELISA-Methode zur Bestimmung des IFN- γ -Gehalts in den Überständen verwendet. Die Überstände der V δ 1- $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden unverdünnt eingesetzt, während die der V δ 2- $\gamma\delta$ -T-Zellen 1:2 mit PBS verdünnt verwendet wurden.

3.2.9 Immunfluoreszenzfärbung:

Die Immunfluoreszenz ermöglicht die Untersuchung der Expression von zellulären Oberflächenantigenen am Durchflusszytometer (FACScan). Hierzu werden Zellen mit fluoreszierenden, monoklonalen Antikörpern markiert und nach Lichtstreuung und Fluoreszenzintensität analysiert. Die Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung (180° -Scatter) gilt als Maß für die Größe der Zellen (kleine Zellen streuen weniger Licht), die in 90° (Side Scatter) als Maß für die Granularität. Die an die Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe, wie z. B. Fluoreszenzisothiozyanat (FITC) und Phytoerythrin (PE) werden wie auch Propidiumiodid (PI), welches nur von toten Zellen aufgenommen wird, bei gleicher Wellenlänge (488 nm) von einem Argon- Laser zur Emission von Lichtimpulsen angeregt. Allophycocyanin (APC) wird von einem Diodenlaser bei 643 nm angeregt. Der Emissionsbereich von FITC (Grünfluoreszenz) liegt zwischen 500 und 570 nm, der von PE (Rotfluoreszenz) reicht von 570 bis 600 nm und der dritte Fluoreszenzfarbstoff (APC) liegt bei 660 nm. Da die Emissionsmaxima von Fluoreszenz 1 (FITC: 525 nm) und Fluoreszenz 2 (PE: 575 nm) oder Fluoreszenz 3 (APC: 660 nm) in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen liegen, die von entsprechenden Detektoren registriert werden, lassen sich zwei Farbstoffe gleichzeitig messen (Zweifarben-Immunfluoreszenz). Zur Messung der Dreifarben- oder Vierfarben-Immunfluoreszenz müssen, u.a. aufgrund der überlappenden Emissionsbereiche der Farbstoffe, die Detektoren für die drei oder vier Fluoreszenzen gegeneinander kompensiert werden. Das elektronische System der Detektoren, der sogenannte Photomultiplier, erhält die Lichtimpulse von der optischen Einheit und übermittelt ein digitalisiertes Signal an den Computer.

3.2.9.1 Vollblutfärbung:

Je 20 µl verdünntes Spenderblut werden in die Vertiefungen einer 96 Kavitäten-Spitzbodenplatte gegeben. Das Blut eines Spenders wird mit Antikörpern jeweils einer Isotypkontrolle (je 7 µl von IgG1-FITC, IgG1-PE, IgG2a-FITC und IgG2a-PE) und mit je 7 µl CD3-PE (1:5 verdünnt) + 7 µl TZR $\gamma\delta$ -FITC (1:3 verdünnt) bzw. + 7 µl TZR $\gamma\delta$ 1-FITC (1:5 verdünnt) bzw. + 7 µl TZR $\gamma\delta$ 2-FITC (1:2 verdünnt) vermischt und für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Dann kommen pro Kavität je 200 µl Lysepuffer zur Auflösung der Erythrozyten für 15 bis 20 Min. hinzu. Nach Abzentrifugieren (4 Min., 1000 rpm) und Waschen mit je 200 µl Waschpuffer werden die Zellen in je 100 µl Waschpuffer aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt, im FACS-Calibur (BD Biosciences) gemessen und mit der CellQuest Pro Software (BD Biosciences) ausgewertet.

3.2.9.2 TLR-Färbungen von $\gamma\delta$ -T-Zellen:

Für den Nachweis der Oberflächenexpression von TLR1, 2, 3, 4, 5 wurden PBMZ mit den unter 3.1.5.3 genannten Antikörpern gefärbt und nach einem Waschschrift mit FITC-markierten anti-V δ 1- oder anti-V δ 2-Antikörpern und PE- oder APC-markierten anti-pan $\gamma\delta$ -Antikörpern gefärbt.

Um intrazellulär gelegene TLR3, 6 und 8 nachzuweisen, wurden 5×10^5 PBMZ zunächst mit FITC-markierten anti-V δ 1- oder anti-V δ 2-Antikörpern und PE- oder APC-markierten anti-pan $\gamma\delta$ -Antikörpern gefärbt und dann gewaschen. In einem zweiten Färbvorgang wurden die Zellen mit dem Cytofix/Cytoperm-Kit von BD Biosciences nach Hersteller-Anweisung fixiert, permeabilisiert und mit den unter 3.1.5.4 genannten anti-TLR-Antikörpern gefärbt, wobei diese für 30 Min. inkubiert wurden.

Alle Proben wurden ebenfalls im FACS-Calibur (BD Biosciences) mit der CellQuest Pro Software (BD Biosciences) ausgewertet.

3.2.10 Caspasen- Bestimmung:

Eine mögliche Induktion von Zelltod bzw. Apoptose von $\gamma\delta$ -T-Zellen nach TZR-Stimulation in An- bzw. Abwesenheit von TLR-Liganden wurde mit dem Caspase-Glo3/7 Assay untersucht. Die Caspasen 3 und 7, welche bei der Apoptose vermehrt in aktivierter Form vorliegen, wurden dabei bestimmt. Bei der angewendeten Methode wurden je 80 µl Zellen nach Entnahme der Überstände mit je 80 µl eines

Reagenz zusammengeführt, das die Zellen lysiert. Außerdem enthält das Reagenz ein luminogenes Substrat (Z-DEVD-Aminoluciferin). Durch die freigesetzten Caspasen 3 und 7 wird der Z-DEVD-Komplex abgespalten und die freigewordene UltraGloTMLuciferase kann reagieren und Licht emittieren. Die per Luminometer gemessene Leuchtintensität ist proportional zur Caspase-Aktivität. Die Intensität wurde direkt nach Zugabe des Reagenz und nach 30, 60, 90 und 120 Min. gemessen.

3.2.11 Statistische Methoden:

Die Werte in den Abbildungen 4, 6, 12, 13 und 15 ergeben sich jeweils aus den Mittelwerten n verschiedener Spender. Zusätzlich sind die jeweiligen Standardabweichungen angegeben.

Der angegebene p-Wert wurde mit Hilfe des Student-t-Testes errechnet. Ein p-Wert $< 0,05$ bedeutet einen signifikanten und $< 0,01$ einen höchst signifikanten Wert.

4. Ergebnisse

4.1 TLR-Expression auf/ in $\gamma\delta$ -T-Zellen

Bisher gibt es nur wenige Daten über die Expression von Toll-like Rezeptoren (TLR) auf T-Zell-Subpopulationen. In der vorliegenden Doktorarbeit lag der Fokus auf der TLR-Expression bei $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulationen. Hierfür wurden frische PBMZ aus dem Blut gesunder Spender verwendet. Die PBMZ wurden mit spezifischen monoklonalen anti-TLR-Antikörpern (anti-TLR-mAk) und parallel mit anti-TZR $\gamma\delta$ -, -V δ 1- und -V δ 2-mAk markiert und durchflusszytometrisch analysiert.

Da $\gamma\delta$ -T-Zellen nur einen geringen Prozentsatz der Lymphozyten ausmachen, wurde bei der Datenaufnahme die $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation gefiltert. Dieses Filtern („Setzen eines Fensters“) erlaubte die genauere Bestimmung der Verteilung der V δ 1- bzw. V δ 2-Ketten innerhalb der $\gamma\delta$ -T-Zellen. Durch die Verwendung von Oberflächen- bzw. intrazellulären Färbungen konnte die Lage der TLR bestimmt werden.

Abbildung 2 zeigt die Analyse der Messergebnisse.

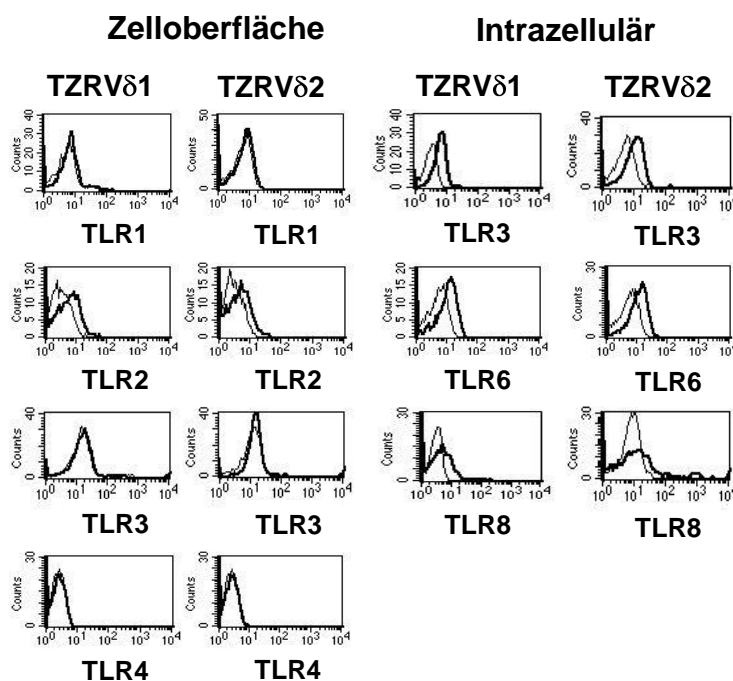


Abbildung 2:

Durchflusszytometrische Analyse der TLR-Expression bei V δ 1- und V δ 2-T-Zellen innerhalb der PBMZ. PBMZ wurden zuerst mit Oberflächen-anti-TLR-mAk und danach mit anti-TZR $\gamma\delta$ -, -V δ 1- und -V δ 2-mAk markiert bzw. zuerst mit anti-TZR-mAk markiert, dann permeabilisiert und fixiert und im Anschluss mit intrazellulären anti-TLR-mAk markiert.

Die dünnen Linien in den Abbildungen entsprechen der Isotyp-Kontrolle, während die dickeren Linien die TLR-gefärbten Zellen darstellen.

Die Resultate sind repräsentativ für mindestens vier Experimente mit verschiedenen Spendern.

Es zeigte sich, dass bei $\gamma\delta$ -T-Zellen innerhalb der PBMZ der TLR1 auf der Zelloberfläche bei einigen untersuchten Spendern gering und bei den meisten Spendern gar nicht exprimiert wurde. TLR2 wurden bei beiden Subpopulationen auf der Oberfläche exprimiert, während TLR3 und 4 nicht detektierbar waren. TLR3 konnte aber intrazellulär detektiert werden, ebenso wie TLR6 und 8, sowohl bei den V δ 1- als auch bei den V δ 2-T-Zellen. Obwohl der TLR6 auf der Zelloberfläche gelegen ist, wird er bei dieser Färbemethode intrazellulär detektiert, weil der entsprechende mAk an die intrazelluläre Domäne des TLR6 bindet.

Zwischen den Subpopulationen zeigten sich bezüglich der TLR-Expression keine deutlichen Unterschiede, außer dass TLR3 in den V δ 2-T-Zellen gelegentlich etwas stärker exprimiert wurde.

Die Expression von TLR5 konnte nicht bestimmt werden, da kein entsprechender mAk zur Detektion zur Verfügung stand.

Weitere Daten aus der Arbeitsgruppe, in der diese Arbeit erstellt wurde, bestätigen die intrazelluläre Expression von TLR3 (Wesch et al., 2006) und ferner die intrazelluläre Expression von TLR7 in frisch isolierten $\gamma\delta$ -T-Zellen. Weiterführende Experimente dieser Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass durch TZR-Stimulation die TLR3-Expression auf der Zelloberfläche von $\gamma\delta$ -T-Zellen nach 24 Stunden hochreguliert und durch zusätzlichen TLR3-Stimulus (Polyinosin-Polycytidyl-Säure, Poly(I:C)) noch gesteigert wird (Wesch et al., 2006).

4.2 Funktionelle Eigenschaften der TLR in $\gamma\delta$ -T-Zellen

$\gamma\delta$ -T-Zellen produzieren nach TZR-Stimulation bestimmte Zytokine wie z.B. IFN- γ und TNF- α und Chemokine wie z.B. RANTES und MIP-1 α .

Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die TZR-stimulierte IFN- γ -Produktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen durch die Zugabe des TLR3-Liganden Poly(I:C) gesteigert werden konnte (Wesch et al., 2006). Der TLR3-Ligand Poly(I:C) wirkte hier als Kostimulus. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob eine Kombination aus TZR- und TLR3-Stimulus oder weiteren TLR-Liganden neben der IFN- γ -Produktion zur Induktion weiterer Zytokine und Chemokine führt.

Frisch isolierte $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden mit Hilfe magnetischer Separation in ihre beiden Subpopulationen V δ 1 und V δ 2 aufgetrennt und über den TZR stimuliert. Eine

zusätzliche Stimulation mit den TLR1,2,3,5,6,7 und 8-Liganden wurde durchgeführt. Im Anschluss wurden die Überstände aller stimulierten (und unstimulierten) Zellen mit Hilfe eines ELISA und eines Cytokine Bead Array (CBA) auf die Produktion von IFN- γ und anderer Zytokine bzw. Chemokine hin untersucht.

Eine verstärkte Zytokin- und Chemokin-Produktion nach kombinierter TZR-TLR-Stimulation konnte beobachtet werden. Ausprägung und Veränderungen in der Zytokin-/Chemokinproduktion sowie Unterschiede zwischen der V δ 1- und V δ 2-Subpopulation und bezüglich der unterschiedlichen TLR sind im Folgenden beschrieben.

4.2.1 Stimulation des TLR3 mit Poly(I:C)

Im Vergleich zu unstimulierten (in Medium kultivierten) $\gamma\delta$ -T-Zellen produzierten die über den TZR stimulierten $\gamma\delta$ -T-Zellen mehr IFN- γ . Das zeigte sich sowohl bei der V δ 1- als auch bei der V δ 2-Subpopulation (s. Abb. 3). Bei einigen Spendern kam es nach alleiniger TLR3-Stimulation mit Poly(I:C) zu erhöhter IFN- γ -Produktion im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Unter den V δ 1-T-Zellen waren es die Hälfte der abgebildeten Spender (s. Abb. 3A) und unter den V δ 2-T-Zellen vier von sechs Spendern (s. Abb. 3B), bei denen es zu einer erhöhten IFN- γ -Produktion kam. Die Konzentration des Zytokins IFN- γ war bei diesen Spendern nach TLR3-Stimulation mindestens genauso stark wie nach TZR-Stimulation. Bei den V δ 2-T-Zellen war die IFN- γ -Konzentration nach TLR3-Stimulation in den meisten Fällen sogar höher als nach TZR-Stimulation.

Des Weiteren konnten die Daten aus der Arbeitsgruppe (Wesch et al., 2006), in welcher vorliegende Arbeit gefertigt wurde, bestätigt werden. Es zeigte sich, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen nach Stimulation mit Poly(I:C) zusätzlich zur TZR-Stimulation verstärkt IFN- γ produzieren im Vergleich zu den alleinigen Stimulationen über TLR3 bzw. über den TZR. Beide $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulationen aller Spender zeigten eine verstärkte Ausschüttung von IFN- γ nach TZR-TLR3-Kostimulation.

In dieser Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die V δ 2-T-Zellen etwa die zehnfach größere Menge an IFN- γ produzieren als die V δ 1-T-Zellen. (Die V δ 2-T-Zellen zwischen ca. 50 pg/ml ohne Stimulation und 2700 pg/ml nach Kostimulation. Die V δ 1-T-Zellen zwischen ca. 5 pg/ml ohne Stimulation und 220 pg/ml nach Kostimulation (s. Abb. 3).)

Abbildung 3 zeigt den Unterschied der beiden Subpopulationen in der IFN- γ -Produktion bei jeweils sechs Spendern gemessen mittels ELISA.

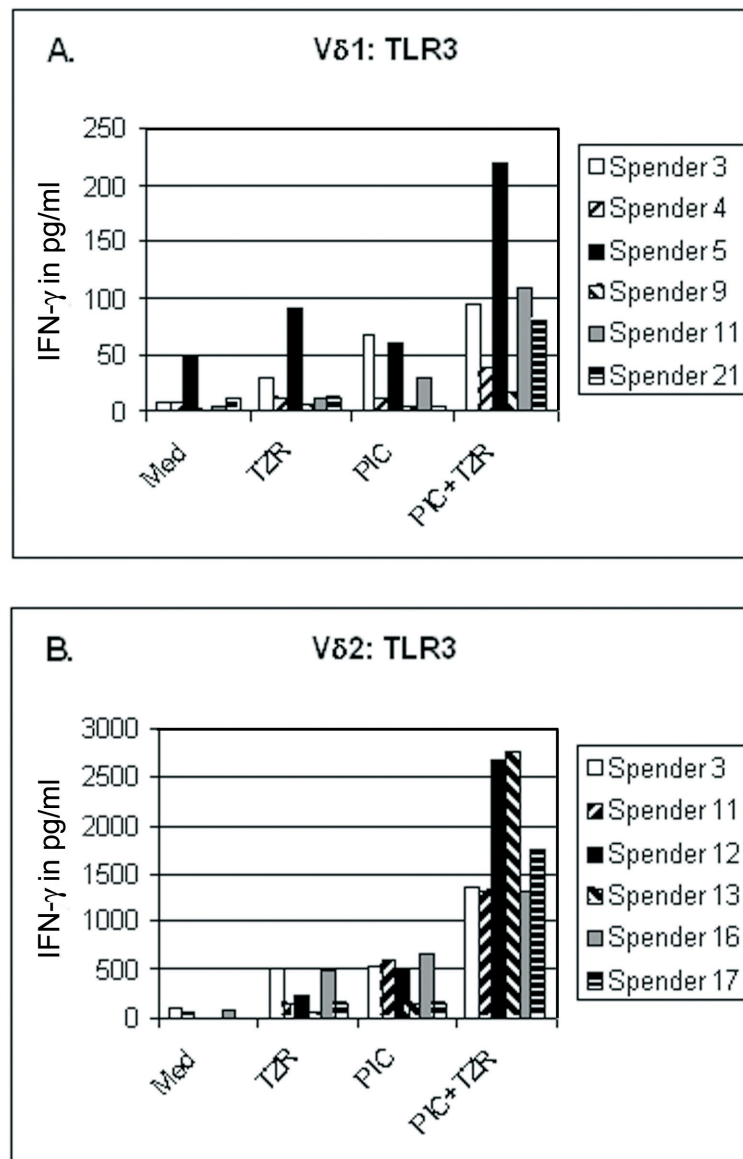


Abbildung 3: Vδ1- und Vδ2-T-Zellen reagieren nach TZR-TLR3-Kostimulation mit deutlich gesteigerter IFN- γ -Produktion.

Frisch isolierte $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden in ihre Subpopulationen aufgetrennt und in Medium kultiviert (Med) bzw. über den TZR mit anti-TZR-mAk (TZR) oder über den TLR3 mit Poly(I:C) (PIC) stimuliert oder in Kombination beider Stimuli (anti-TZR-mAk + Poly(I:C) (PIC+TZR)).

In einigen weiteren Experimenten wurde zusätzlich der Wachstumsfaktor IL-2 in einer Konzentration von 25 U/ml eingesetzt, um die Zellen zur verstärkten Zytokin-/Chemokinproduktion anzuregen. IL-2 wurde parallel zu den unstimulierten bzw. stimulierten $\gamma\delta$ -T-Zellen gegeben und für 24 Stunden inkubiert.

Bei $\gamma\delta$ -T-Zellen, die ausschließlich mit IL-2 stimuliert wurden, wurde im Vergleich zu den in Medium kultivierten Zellen eine Steigerung der IFN- γ -Produktion sichtbar. Bei den V δ 1-T-Zellen war diese Steigerung gering, aber bei den V δ 2-T-Zellen deutlich (s. Abb. 4).

Die unter TZR-Stimulation (bei den V δ 2-T-Zellen hoch signifikant) gesteigerte IFN- γ -Produktion konnte mit zusätzlicher IL-2-Zugabe bei beiden Subpopulationen weiter erhöht werden. Hier war die Steigerung bei den V δ 1-T-Zellen um den Faktor sieben höher (s. Abb. 4A) als bei den V δ 2-T-Zellen, die die Konzentration von IFN- γ unter TZR-Stimulation mit IL-2 in etwa verdreifachten (s. Abb. 4B).

Nach alleiniger TLR3-Stimulation konnte die IFN- γ -Produktion bei den V δ 2-T-Zellen in hoch signifikantem Maß gesteigert werden. Die IFN- γ -Freisetzung konnte nach Poly(I:C)-Stimulation bei beiden Subpopulationen durch zusätzliches IL-2 weiter gesteigert werden. Die V δ 2-T-Zellen waren durch den kombinierten Einsatz von Poly(I:C) und IL-2 deutlich stärker aktivierbar als die V δ 1-T-Zellen unter denselben Stimulationsbedingungen.

Die in früheren Experimenten dieser Arbeitsgruppe beobachtete Steigerung der IFN- γ -Produktion nach TZR-TLR3-Kostimulus konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Bei der V δ 1-Subpopulation war die Steigerung unter Kostimulation im Vergleich zu den unstimulierten und zu den TZR-stimulierten V δ 1-T-Zellen signifikant. Bei der V δ 2-Subpopulation war die Steigerung der IFN- γ -Produktion unter TZR-TLR3-Kostimulation im Vergleich zu den in Medium kultivierten Zellen und zu den isolierten TZR- bzw. TLR3-stimulierten Zellen sogar hoch signifikant. Durch den zusätzlichen Einsatz von IL-2 konnte die IFN- γ -Produktion noch weiter gesteigert werden. Bei den V δ 1-T-Zellen konnte die IFN- γ -Produktion nach TZR/TLR-Stimulation in der Anwesenheit von IL-2 verdoppelt werden (s. Abb. 4A). Bei den V δ 2-T-Zellen konnte die hohe IFN- γ -Produktion nach TZR-TLR3-Kostimulation unter Zusatz von IL-2 nur noch geringfügig erhöht werden (s. Abb. 4B).

Zusammenfassend wird daraus ersichtlich, dass IL-2 bei V δ 2-T-Zellen im Gegensatz zu V δ 1-T-Zellen das TZR-Signal ersetzen konnte. Eine weitere Steigerung der IFN- γ -

Produktion bei gleichzeitiger TZR-TLR3-Kostimulation und IL-2-Einsatz im Vergleich zum Kostimulus konnte aber kaum erreicht werden.

Abbildung 4 zeigt die beiden Subpopulationen im Vergleich mit und ohne IL2- Einsatz bei der TLR3-Stimulation.

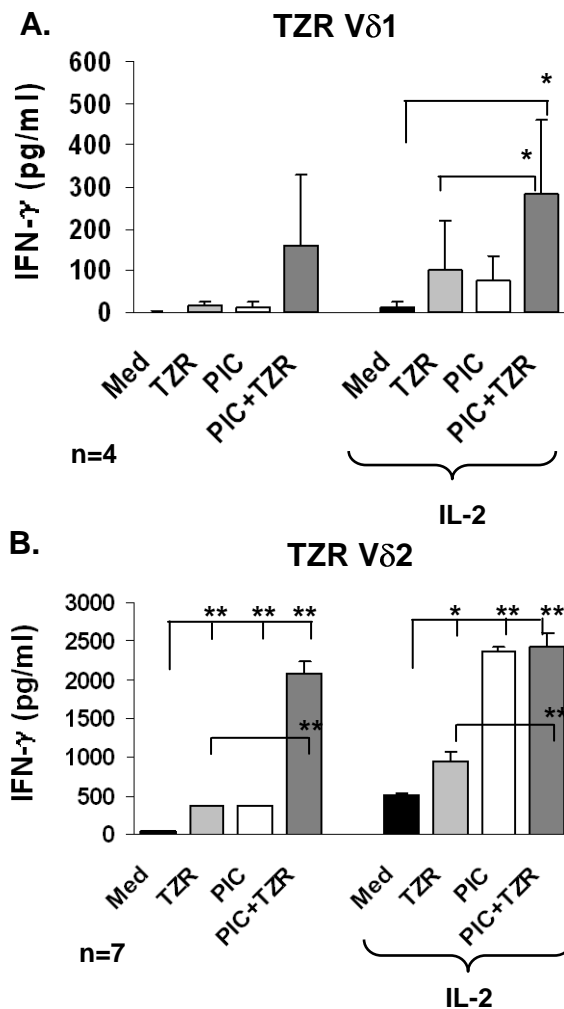


Abbildung 4:

Durch Zugabe von IL-2 (25U rIL-2) kann die IFN-γ-Produktion bei Vδ1- und Vδ2-γδ-T-Zellen gesteigert werden.

Frisch isolierte γδ-T-Zellen wurden in ihre Subpopulationen aufgetrennt und in Medium (Med) kultiviert oder durch Kreuzvernetzung der TZR mit Hilfe von Kaninchen anti-Maus Ig stimuliert (TZR). Die Zellen wurden mit Poly(I:C) (PIC) oder/und IL-2 wie angegeben versetzt. Aus den Überständen wurden nach 24h die IFN-γ-Freisetzung mit ELISA bestimmt.

Die Werte ergeben sich aus einem Mittelwert +/- Standardabweichung aus vier (Vδ1-) bzw. sieben (Vδ2-) Experimenten. *p < 0,05, **p < 0,01

Auch die Messungen weiterer Zytokine bzw. Chemokine mit Hilfe des CBA zeigte die kostimulatorische Wirkung von Poly(I:C) zusätzlich zur TZR-Stimulation bei beiden γδ-T-Zell-Subpopulationen:

Zusätzlich zu einer verstärkten IFN-γ-Produktion induzierte die isolierte TZR-Stimulation und die Zugabe von Poly(I:C) in TZR-stimulierten Vδ2-T-Zellen eine erhöhte Produktion von TNF-α und GM-CSF (s. Abb. 5A u. B). Vδ1-T-Zellen produzierten weniger TNF-α als Vδ2-T-Zellen, aber auch hier war die kostimulierende Wirkung von Poly(I:C) erkennbar (s. Abb. 5A). Ferner produzierten Vδ1-T-Zellen im Unterschied zu Vδ2-T-Zellen kein GM-CSF, und dies wurde auch

nicht durch einen kostimulierenden Effekt von Poly(I:C) induziert (Daten nicht gezeigt).

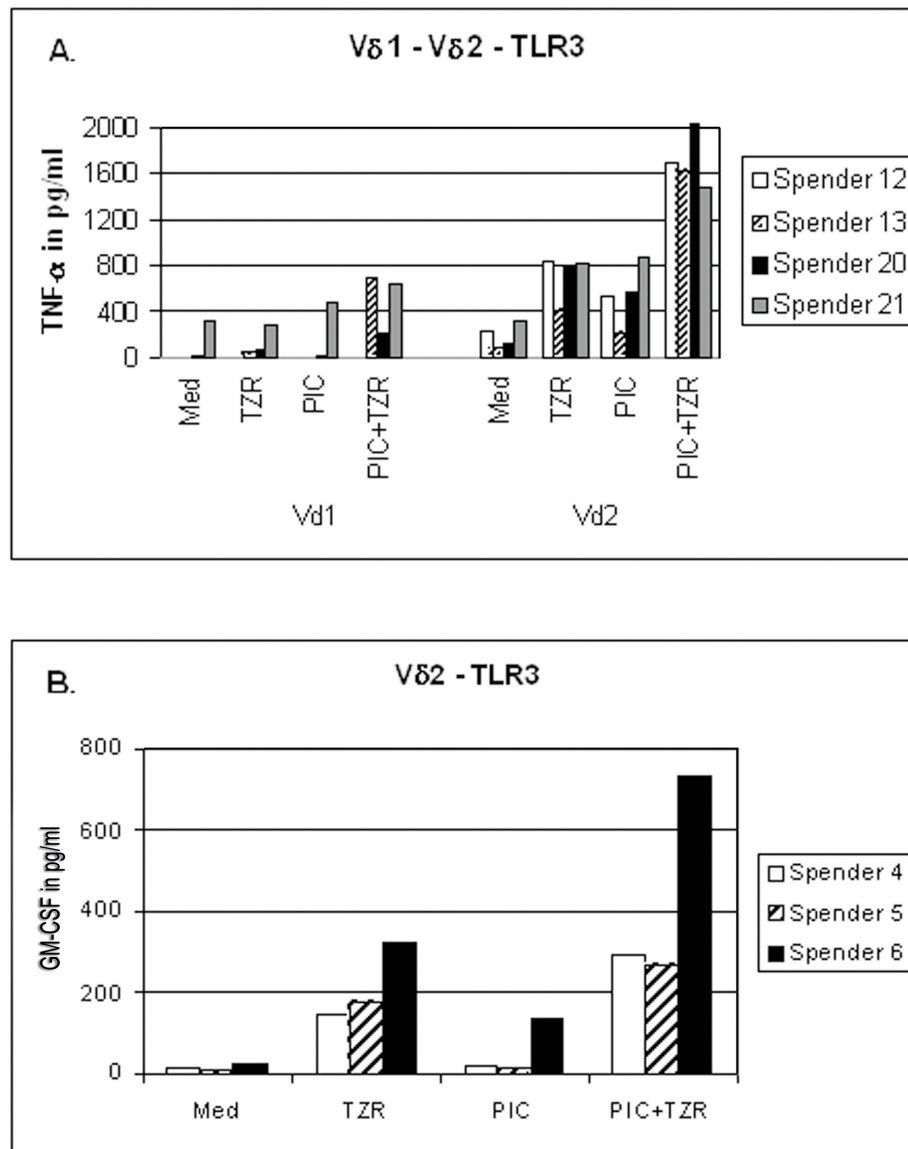


Abbildung 5: TZR-TLR3-Kostimulation induziert die Zytokine TNF- α und GM-CSF in V δ 2-T-Zellen und TNF- α in V δ 1-T-Zellen.

In ihre Subpopulationen aufgeteilte $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden in Medium kultiviert (Med) bzw. über den TZR oder den TLR3 mit Poly(I:C) (PIC) stimuliert oder gleichzeitig über TZR und TLR3 kostimuliert (PIC+TZR). Aus den Überständen wurden die genannten Zytokine mittels CBA bestimmt.

A. Bei V δ 1- und V δ 2-T-Zellen kam es nach TLR3+TZR-Kostimulation in drei bzw. vier verschiedenen Spendern zur TNF- α -Produktion.

B. Bei V δ 2-T-Zellen von drei verschiedenen Spendern wurde nach TZR-Stimulation und TZR-TLR3-Kostimulation eine GM-CSF-Produktion induziert.

In keinem der Experimente konnten die Zytokine IL-4 und IL-12 detektiert werden.

Neben der konstitutiven Produktion von MIP-1 α und RANTES zeigte sich eine gesteigerte Produktion dieser Chemokine bei beiden Subpopulationen nach Stimulation der Zellen (s. Abb. 6B u. C).

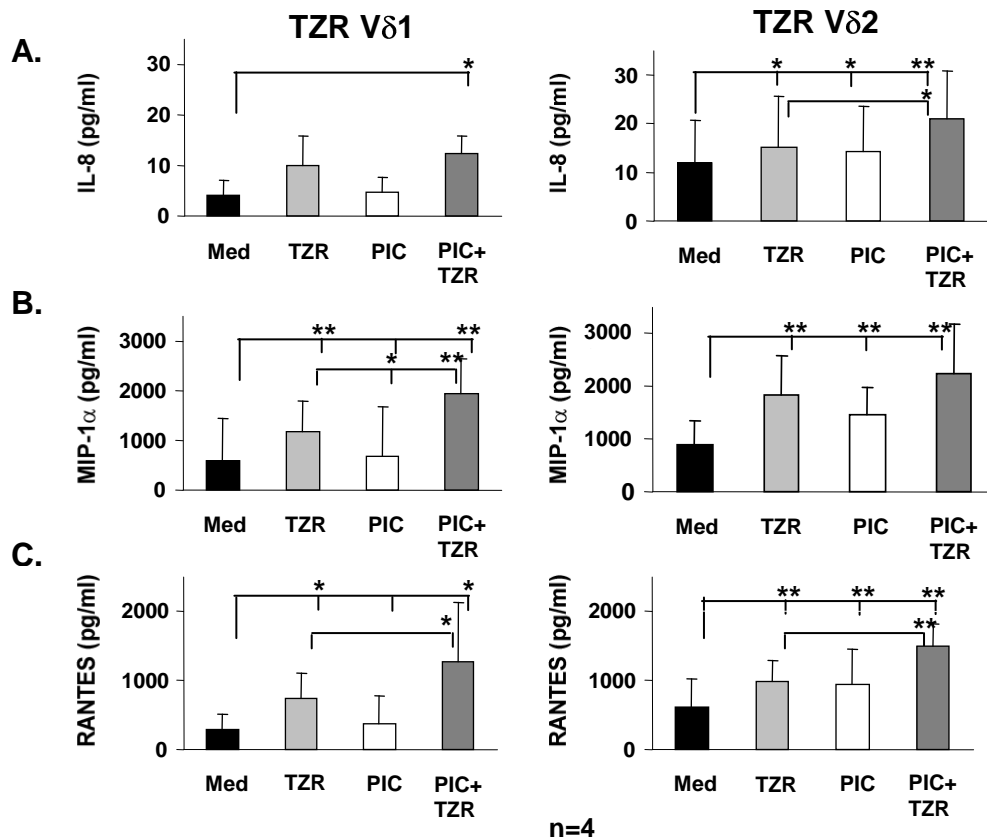


Abbildung 6:

TZR-TLR3-Kostimulation verstärkt die Produktion der Chemokine IL-8, MIP-1 α und RANTES bei Vδ1- und Vδ2-T-Zellen.

In ihre Subpopulationen aufgeteilte $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden in Medium kultiviert (Med) bzw. über den TZR oder den TLR3 mit Poly(I:C) (PIC) stimuliert oder gleichzeitig über TZR und TLR3 kostimuliert (PIC+TZR). Aus den Überständen wurden die genannten Chemokine mittels CBA bestimmt.

A. IL-8-Konzentration

B. MIP-1 α -Konzentration

C. RANTES-Konzentration nach vier verschiedenen Stimulationen

Die Werte ergeben sich aus einem Mittelwert \pm Standardabweichung aus vier Experimenten. *p < 0,05, **p < 0,01.

Nach TZR-Stimulation kam es bei Vδ1- und Vδ2-T-Zellen zu einer hoch signifikanten Steigerung der MIP-1 α -Produktion (s. Abb. 6B). Bei Vδ1-T-Zellen kam es zu einer signifikanten und bei Vδ2-T-Zellen zu einer hoch signifikanten Steigerung der RANTES-Produktion (s. Abb. 6C). Die alleinige TLR3-Stimulation führte sowohl bei Vδ1-T-Zellen als auch bei Vδ2-T-Zellen zu einer signifikant gesteigerten Produktion von MIP-1 α und bei Vδ2-T-Zellen auch von RANTES. Nach kombinierter TZR- und

TLR3-Stimulation zeigte sich eine noch stärkere Steigerung dieser beiden Chemokine bei beiden Subpopulationen. Die IL-8-Produktion war insgesamt sehr gering ($< 25\text{pg/ml}$) und konnte bei den $V\delta 1$ -T-Zellen nur durch TZR-TLR3-Kostimulus mit Poly(I:C) verstärkt werden (s. Abb. 6A). Bei den $V\delta 2$ -T-Zellen wurde sowohl nach alleiniger TZR- als auch nach alleiniger TLR3-Stimulation und bei kombinierter Stimulation dieser Rezeptoren die IL-8-Produktion im Vergleich zu den unstimulierten Zellen signifikant verstärkt.

Das Chemokin IP-10 wurde bei zwei getesteten Spendern von den $\gamma\delta$ -T-Zellen nur in geringen Konzentrationen freigesetzt. Nach Stimulation der Zellen über den TZR oder TLR3 blieben die Konzentrationen fast unverändert (s. Abb. 7).

Bei einem der beiden Spender wurde die IP-10-Produktion nach TZR-TLR3-Kostimulation sowohl bei den $V\delta 1$ - als auch bei den $V\delta 2$ -T-Zellen deutlich gesteigert, bei dem anderen Spender kam es zu keiner Veränderung der IP-10-Produktion.

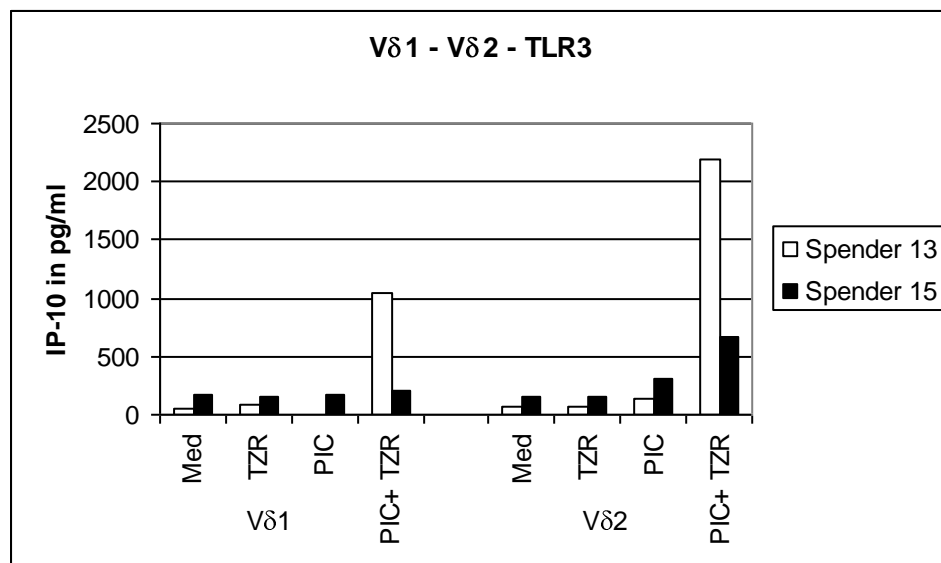


Abbildung 7: $\gamma\delta$ -T-Zellen reagieren spenderabhängig auf TZR-TLR3-Kostimulation mit erhöhter IP-10-Produktion.

Nach Auftrennung in die $V\delta 1$ - und $V\delta 2$ -T-Zell-Subpopulationen wurden die Zellen in Medium kultiviert (Med) oder über den TZR bzw. mit Poly(I:C) über den TLR3 stimuliert (PIC) oder über TZR und TLR3 kostimuliert (PIC+TZR). Die IP-10-Konzentration wurde mit Hilfe eines CBA bestimmt.

Zusammenfassend kann herausgestellt werden, dass der TLR3-Ligand Poly(I:C) nur in Kombination mit einem TZR-Signal die Zytokine IFN- γ , TNF- α und GM-CSF und die Chemokine MIP-1 α , RANTES, IL-8 und IP-10 bei $\gamma\delta$ -T-Zellen verstärkt induzieren

kann. Bei einigen Spendern kommt es auch bei der isolierten TLR3-Stimulation zur erhöhten Produktion der genannten Zytokine und Chemokine.

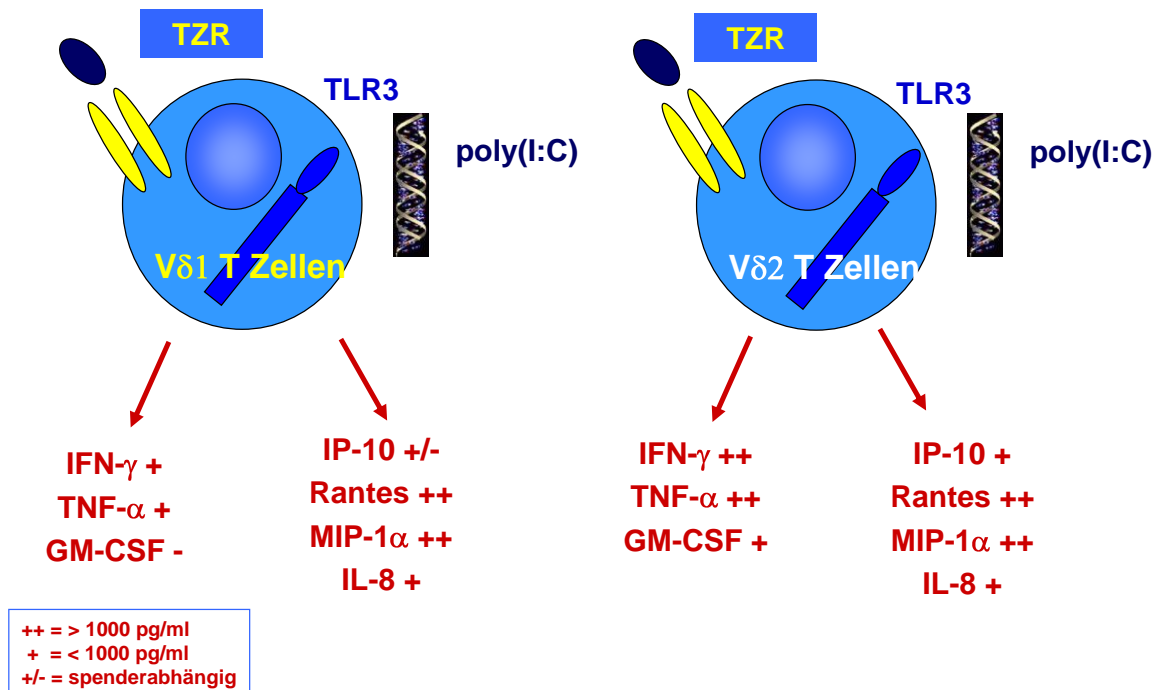


Abbildung 8: Zusammenfassende Darstellung der Zytokinproduktion nach kombinierter TZR-TLR3-Stimulation bei Vδ1- und Vδ2-T-Zellen. (++ = > 1000 pg/ml, + = < 1000 pg/ml, +/- = spenderabhängig).

4.2.2 Stimulation des TLR7 mit Imiquimod

Die natürlichen Liganden des TLR7 und 8 sind virale, einzelsträngige RNA (Heil et al., 2004). Gorden et al. (2005) konnten durch synthetische TLR7/8-Liganden, wie z.B. Imidazoquinoline, die Produktion der Zytokine IFN- α , TNF- α und IL-12 bei PBMZ stimulieren und zeigen, dass TLR7 und 8 hauptsächlich in APZ (Monozyten, dendritische Zellen) exprimiert werden.

In der Arbeitsgruppe, in der die vorliegende Arbeit erstellt wurde, konnte die Expression von TLR7 und 8 in $\gamma\delta$ -T-Zellen auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden (s. Abb. 2, Beetz et al., 2007, Pietschmann et al., 2009).

Zur Prüfung der Funktionalität von TLR7 und 8 wurden in dieser Arbeit $V\delta 1^+$ - und $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulationen mit den TLR7/8-Liganden Imiquimod (R848) und Einzelstrang-RNA (ssRNA 40 und sspolyU) stimuliert.

Nach Stimulation der Zellen mit dem TLR7-Liganden Imiquimod und nach kombinierter TZR-TLR7-Stimulation mit Imiquimod in verschiedenen Konzentrationen zeigte sich bei den $V\delta 1$ -T-Zellen keine veränderte $IFN-\gamma$ -Produktion (Daten nicht gezeigt). Bei den $V\delta 2$ -T-Zellen zeigte sich eine spenderabhängige Reaktion: Bei einem von drei Spendern kam es zur erhöhten $IFN-\gamma$ -Produktion nach isolierter TLR7-Stimulation im Vergleich zu unstimulierten $V\delta 2$ -T-Zellen (s. Abb. 9, Spender 10). Dieser Spender steigerte außerdem die $IFN-\gamma$ -Produktion nach TZR-TLR7-Kostimulation, ebenso wie ein weiterer Spender (s. Abb. 9, Spender 8). Vergleichend wurde in Abbildung 9 zusätzlich die Stimulation des TLR3 mit Poly(I:C) dargestellt.

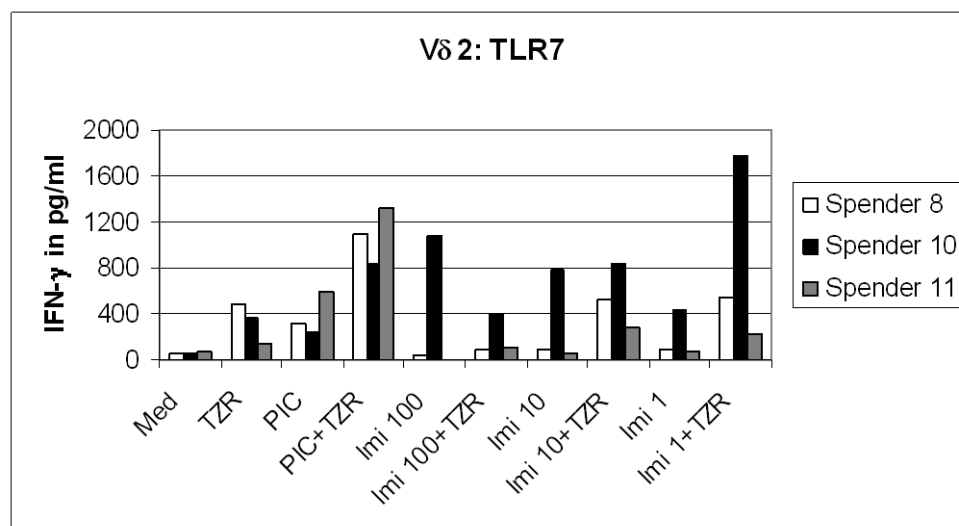


Abbildung 9: **$V\delta 2$ -T-Zellen reagieren spenderabhängig auf TLR7-Stimulation mit verstärkter $IFN-\gamma$ -Produktion.**

Nach Separation der $V\delta 2$ -T-Zellen wurden diese in Medium kultiviert (Med) bzw. über den TZR stimuliert oder über TLR7 mit verschiedenen Konzentrationen von Imiquimod stimuliert (Imi = Imiquimod in den Konzentrationen 100 μ g/ml (Imi100), 10 μ g/ml (Imi10), 1 μ g/ml (Imi1)).

Einige Zellen wurden gleichzeitig über TZR und TLR7 stimuliert (Imi+TZR). Zum Vergleich wurden die $V\delta 2$ -T-Zellen auch isoliert über TLR3 mit Poly(I:C) (Konzentration 50 μ l/ml) stimuliert oder über TZR und TLR3 kostimuliert (PIC+TZR).

Die Stimulation des TLR8 mithilfe von ssRNA 40 und sspolyU erbrachte in beiden Subpopulationen keine Veränderung in ihrer $IFN-\gamma$ -Produktion.

Aus diesem Grund wurde auf die Untersuchung weiterer Zytokine verzichtet.

4.2.3 Stimulation der TLR1,2 und 6 mit Pam₂CSK4, Pam₃CSK4 und FSL-1

Deetz et al. haben 2006 eine gesteigerte IFN- γ -Produktion bei humanen V δ 2-T-Zelllinien nach Kostimulation mit Pam₃Cys beobachtet. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob TLR2-Liganden auch frisch isolierte $\gamma\delta$ -T-Zellen zur erhöhten Zytokin-/Chemokin-Produktion anregen.

TLR2 erkennt seine Liganden, indem es einen Heterodimer mit TLR1 oder TLR6 oder möglicherweise mit TLR10 formt (Hasan et al., 2005). In vorliegender Arbeit wurde zur Stimulation der $\gamma\delta$ -T-Zellen über TLR2 und 6 oder über TLR2 und einen weiteren TLR (evtl. TLR10) Pam₂CSK4 verwendet.

Bei den V δ 1-T-Zellen war keine veränderte IFN- γ -Produktion nach isolierter Stimulation mit Pam₂CSK4 oder kombinierter TZR-TLR2-Stimulation zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Eine verstärkte Aktivierung der V δ 2-T-Zellen wurde anhand der erhöhten IFN- γ -Produktion nach TZR-Stimulation und nach Stimulation mit dem TLR2-Liganden im Vergleich zu unstimulierten Zellen ersichtlich (s. Abb. 10).

Nach TZR-TLR2(6)-Kostimulation zeigten die V δ 2-T-Zellen eine geringere IFN- γ -Ausschüttung als die Zellen derselben Spender unter TZR-TLR3-Kostimulation (s. Abb. 10B). Es kam aber unter TZR-TLR2(6)-Kostimulation zu einer gesteigerten IFN- γ -Produktion im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Bei drei Spendern war die IFN- γ -Produktion nach TZR-TLR2(6)-Kostimulation auch im Vergleich zur alleinigen TZR-Stimulation verstärkt, wenn Pam₂CSK4 in höherer Konzentration ($\geq 1\mu\text{g pro ml}$) eingesetzt wurde (s. Abb. 10A).

Abbildung 10 zeigt unter A die IFN- γ -Produktion ohne und nach TZR-, TLR2 und kombinierter Stimulation von V δ 2-T-Zellen sechs verschiedener Spender. Unter B ist zusätzlich die IFN- γ -Produktion nach einfacher und kombinierter TLR3-/TZR-TLR3-Stimulation abgebildet.

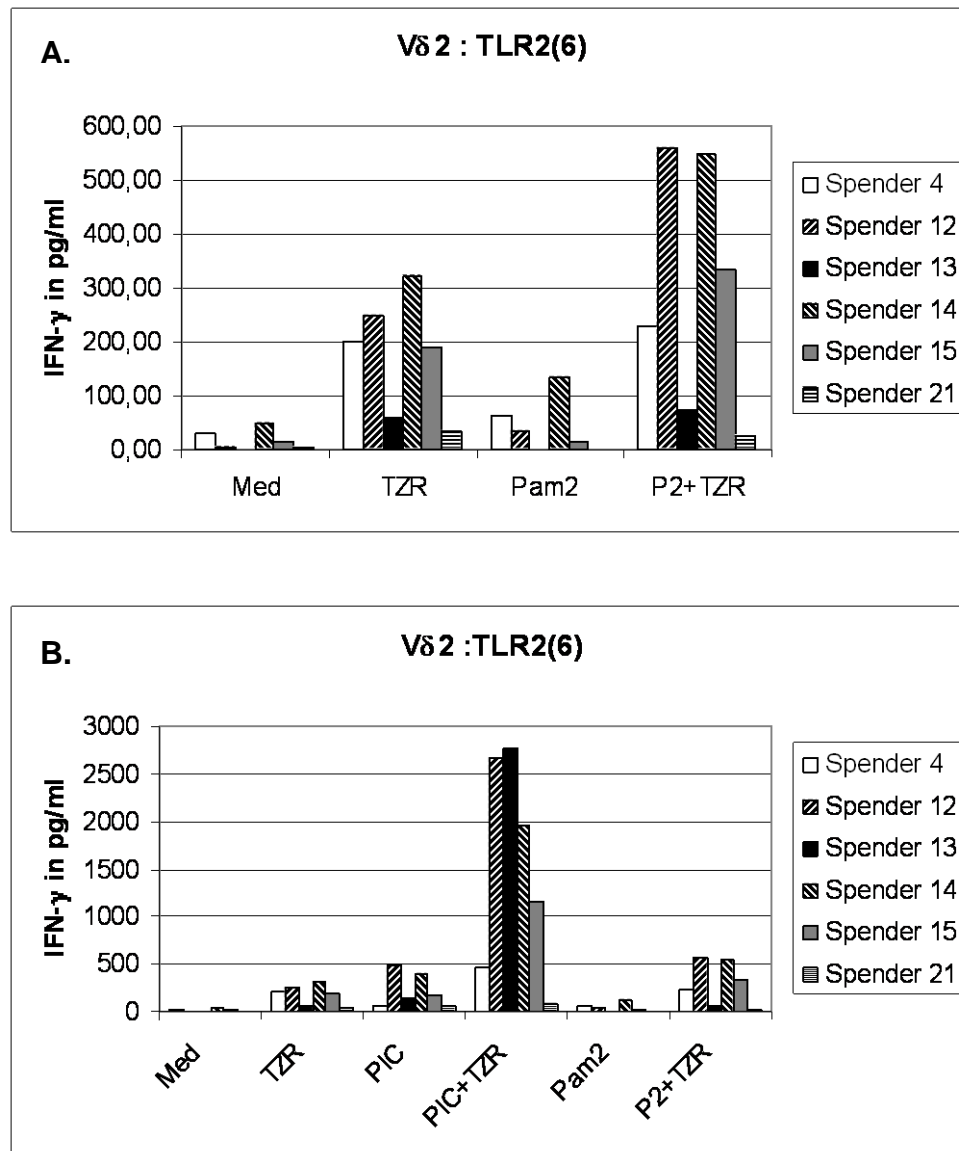


Abbildung 10: Vδ2-T-Zellen reagieren spenderabhängig auf TZR-TLR2(6)-Kostimulation mit verstärkter IFN-γ-Produktion. **A.** Nach Separation der Vδ2-T-Zellen wurden diese in Medium kultiviert (Med) bzw. über den TZR stimuliert oder über TLR2(6) mit Pam₂CSK4 (Konzentration 1 μl/ml) stimuliert. Einige Zellen wurden gleichzeitig über TZR und TLR2(6) kostimuliert (P2+TZR). **B.** Wie A, jedoch zusätzlich mit vergleichender Darstellung der TLR3-/TZR-TLR3-Stimulation mit Poly(I:C) (PIC/PIC+TZR).

Vergleichbare Ergebnisse erzielte die Inkubation der Zellen mit dem TLR1/2-Liganden Pam₃CSK4. Die Vδ1-T-Zellen verhielten sich wie die unstimulierte Vergleichsgruppe (Daten nicht dargestellt), während die Vδ2-T-Zellen mit vermehrter Aktivität auf Pam₃CSK4 als Kostimulus zusätzlich zur TZR-Stimulation reagierten (s. Abb. 11B). Im Vergleich zur TZR-TLR3-Kostimulation war die Steigerung der IFN-γ-Produktion aber weniger stark (s. Abb. 11A).

Abbildung 11 zeigt unter A die IFN- γ -Produktion von V δ 2-T-Zellen sechs verschiedener Spender ohne Stimulation und nach TZR-, TLR1/2- und kombinierter TZR-TLR1/2-Stimulation und im Vergleich dazu nach TLR3- und kombinierter TZR-TLR3-Stimulation. Unter B wird der Fokus auf die TLR1/2- und TZR-TLR1/2-Stimulation gelegt, um die IFN- γ -Konzentrationen in geringeren Mengen genauer sichtbar zu machen.

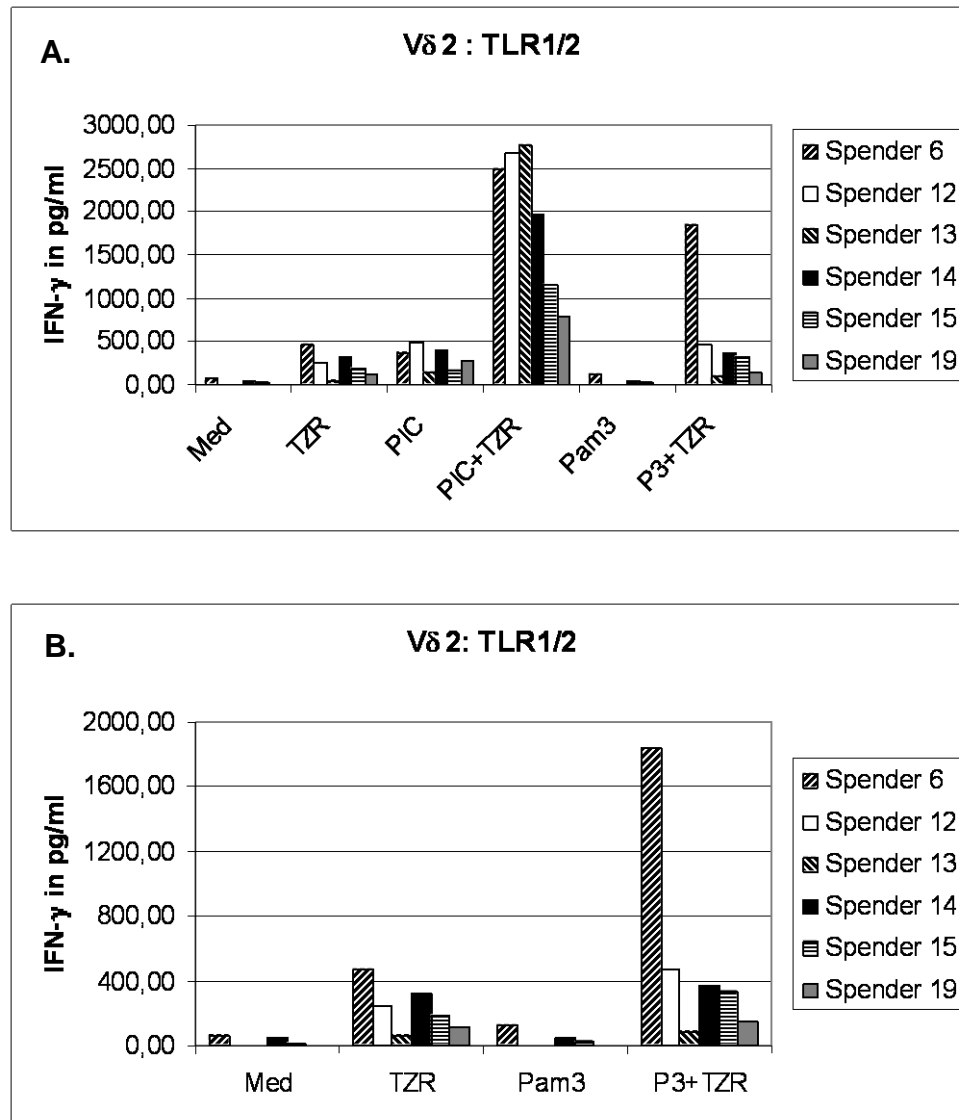


Abbildung 11: **V δ 2-T-Zellen reagieren spenderabhängig auf TZR-TLR1/2-Kostimulation mit verstärkter IFN- γ -Produktion.** **A.** Nach Separation der V δ 2-T-Zellen wurden diese in Medium kultiviert (Med) bzw. über den TZR stimuliert oder über TLR1/2 mit Pam₃CSK4 (Konzentration 1 μ l/ml) stimuliert. Einige Zellen wurden gleichzeitig über TZR und TLR1/2 kostimuliert (P3+TZR). Vergleichend dargestellt ist die TLR3-/TZR-TLR3-Stimulation mit Poly(I:C) (PIC/PIC+TZR). **B.** zeigt einen vergrößerten Ausschnitt zur deutlicheren Darstellung der IFN- γ -Konzentrationen unter TLR1/2-Stimulation.

Parallele Experimente in der Arbeitsgruppe, in der diese Arbeit durchgeführt wurde, haben gezeigt, dass es eine interindividuelle Heterogenität in der Expression von TLR1, 2 und 6 bei regulatorischen T-Zellen gibt (Oberg et al., 2010). Oberg und Kollegen erhielten die deutlichste Antwort auf die TLR2-Stimulation mit einer Mischung der verschiedenen TLR2-Liganden.

Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine individuell unterschiedliche Expression des TLR1 (s. Abb. 2). Deshalb kam in weiteren Experimenten dieser Arbeit auch eine Mischung aus Pam₂CSK4, Pam₃CSK4 und FSL-1 zum Einsatz, die den isolierten Liganden entsprechende Ergebnisse brachten: V δ 1-T-Zellen reagierten nicht auf die alleinige Stimulation mit TLR1/2/6-Liganden, aber auf die kombinierte TZR-TLR1/2/6-Stimulation mit signifikant erhöhter IFN- γ -Produktion im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Die kombinierte Stimulation verursachte auch im Vergleich zur alleinigen TZR-Stimulation eine signifikante Verstärkung der IFN- γ -Produktion.

V δ 2-T-Zellen reagierten mit signifikant erhöhter IFN- γ -Produktion auf die TZR- bzw. auf die TLR1/2/6-Stimulation und weiterer signifikanter Verstärkung nach TZR-TLR1/2/6-Kostimulus im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Auch im Vergleich zur TZR-Stimulation war die IFN- γ -Produktion nach TLR1/2/6-Stimulation und nach TZR-TLR1/2/6-Kostimulation signifikant erhöht (s. Abb. 12a).

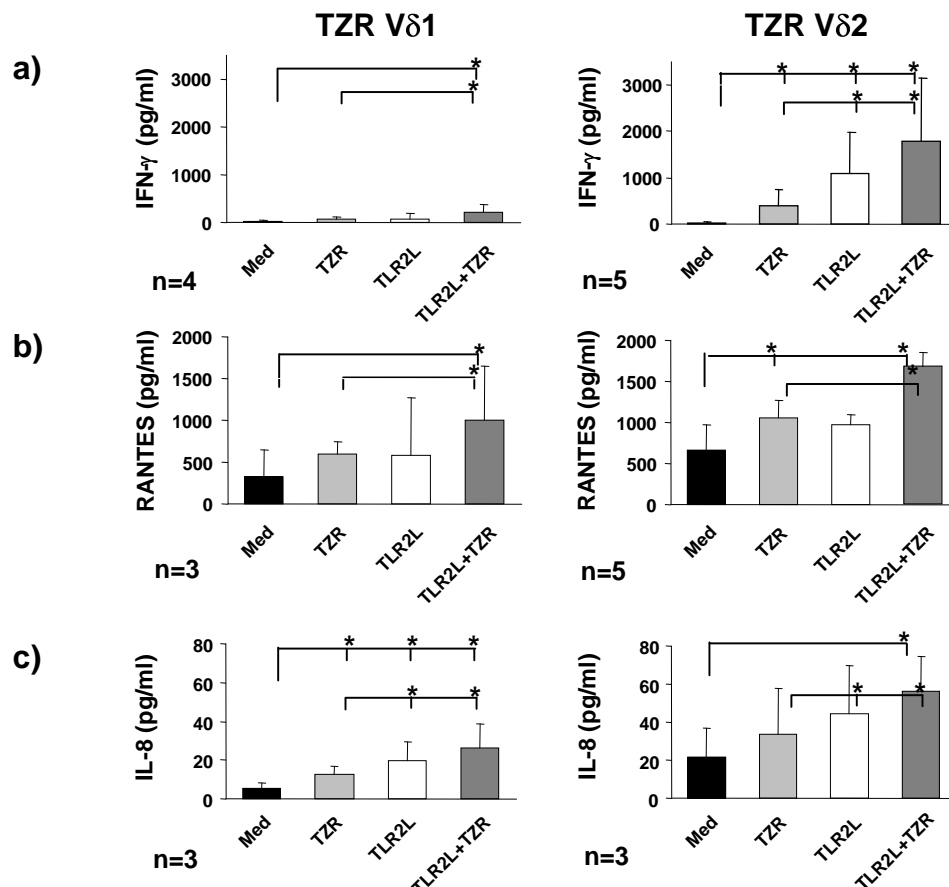


Abbildung 12: Neben (a) IFN- γ induzieren TLR1/2/6-Liganden und TZR-Stimulation die Chemokine (b) RANTES und (c) IL-8 bei $\gamma\delta$ -T-Zellen.

Nach Auftrennung der V δ 1- und V δ 2-Subpopulationen wurden die Zellen in Medium kultiviert (Med) oder über den TZR bzw. die TLR1/2/6 mit einer Mischung aus Pam₂CSK4, Pam₃CSK4 und FSL-1 stimuliert (TLR2L). Einige Zellen wurden kombiniert über den TZR und TLR1/2/6 kostimuliert (TLR2L+TCR). Aus den Überständen wurden die Zytokin-/Chemokinkonzentrationen mit Hilfe eines CBA bestimmt.

Die Werte ergeben sich aus einem Mittelwert \pm Standardabweichung aus n Experimenten. *p < 0,05, **p < 0,01.

Die Auswertung des CBA nach Stimulation mit TLR1/2/6-Liganden ergab folgende Ergebnisse:

RANTES wurde schon konstitutiv, d.h. ohne jegliche Stimulation und in großen Mengen (> 200pg/ml) von beiden Subpopulationen gebildet. Die V δ 2-T-Zellen produzierten insgesamt größere Mengen an RANTES als die V δ 1-T-Zellen.

Sowohl der TZR-Stimulus als auch die TLR1/2/6-Stimulation alleine erhöhte bei beiden Subpopulationen die RANTES-Produktion im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Im Falle der V δ 2-T-Zellen war die TZR-induzierte RANTES-Produktion signifikant erhöht gegenüber der Mediumkontrolle. Eine signifikante Steigerung der RANTES-Produktion war sowohl bei V δ 1- als auch bei V δ 2-T-Zellen nach

kombinierter Stimulation über den TZR und mit den TLR1/2/6-Liganden zu beobachten (s. Abb. 12b).

IL-8 wurde von den $\gamma\delta$ -T-Zellen insgesamt nur in geringen Mengen produziert ($< 60\text{pg/ml}$), wobei die $V\delta 2$ -T-Zellen auch hier wieder die stärkeren Produzenten waren. Die TZR-Stimulation zeigte einen gering steigernden Effekt auf die IL-8-Produktion im Vergleich zu unstimulierten Zellen bei beiden Subpopulationen. Bei den $V\delta 1$ -T-Zellen war diese Steigerung nach TZR-Stimulus im Vergleich zur Mediumkontrolle signifikant. Die TLR1/2/6-Stimulation konnte die IL-8-Produktion ebenfalls steigern. Bei den $V\delta 1$ -T-Zellen war die Steigerung der IL-8-Produktion nach dieser Stimulation gegenüber den unstimulierten und den TZR-stimulierten Zellen signifikant. Bei den $V\delta 2$ -T-Zellen war die Steigerung gegenüber den TZR-stimulierten Zellen signifikant. Ein kostimulatorischer Effekt nach TZR-TLR1/2/6-Stimulation ließ sich anhand einer Steigerung der IL-8-Produktion bei beiden Subpopulationen erkennen. Sowohl bei der $V\delta 1$ -Subpopulation als auch bei der $V\delta 2$ -Subpopulation war die IL-8-Produktion im Vergleich zu allen anderen Stimulationen bzw. zur unstimulierten Kontrollgruppe signifikant erhöht (s. Abb. 12c).

Nach der Stimulation der TLR1, 2 und 6 mit den Liganden Pam₂CSK4 und Pam₃CSK4 wurden weitere Zytokine mit Hilfe des CBA bestimmt (s. Abb. 13).

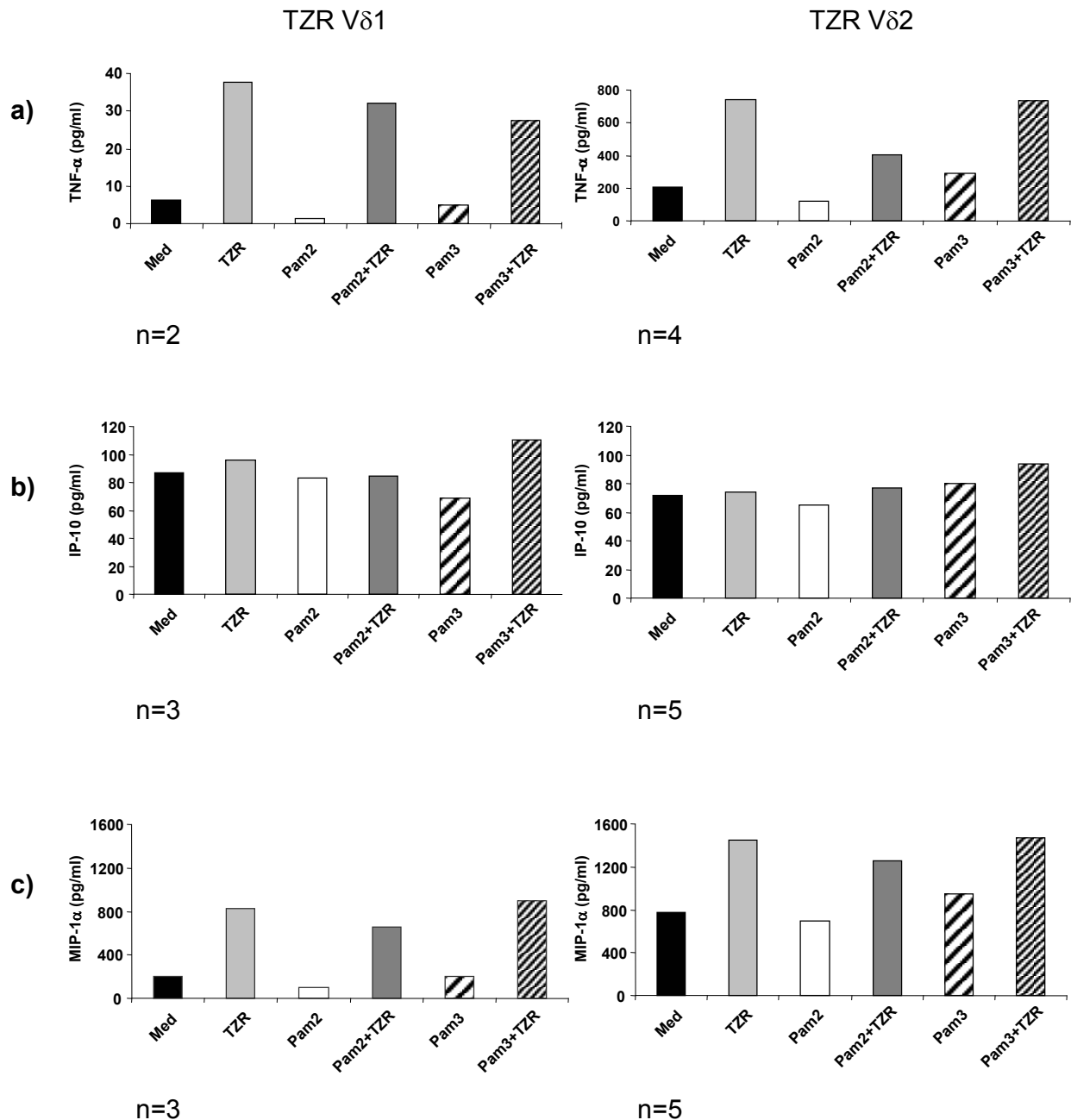


Abbildung 13: Die über TZR-Stimulation induzierte (a) TNF- α , (b) IP-10- und (c) MIP-1 α -Produktion in $\gamma\delta$ -T-Zellen lässt sich durch TLR1/2/6-Liganden nicht weiter steigern.

Nach Auftrennung der V δ 1- und V δ 2-Subpopulationen wurden die Zellen in Medium kultiviert (Med) oder über den TZR bzw. die TLR1/2 mit Pam₃CSK4 (Pam3, Konzentration 1 μ l/ml) oder TLR2(6) mit Pam₂CSK4 (Pam2, Konzentration 1 μ l/ml) stimuliert. Einige Zellen wurden gleichzeitig über den TZR und die TLR1/2 bzw. TLR2(6) kostimuliert. Aus den Überständen wurden die Zytokine/Chemokine TNF- α , IP-10 und MIP-1 α mittels CBA bestimmt.

Die Werte ergeben sich aus einem Mittelwert. n bezeichnet die jeweilige Anzahl an Experimenten.

Das TH1-Zytokin TNF- α wurde von den V δ 1-T-Zellen in sehr geringen Mengen (< 40 pg/ml) freigesetzt, während die V δ 2-T-Zellen TNF- α in deutlich höheren Mengen (> 150 pg/ml), auch konstitutiv produzierten. Die TNF- α -Produktion wurde nach TZR-Stimulation bei beiden Subpopulationen deutlich gesteigert. Eine weitere Steigerung

durch TZR-TLR1/2/6-Kostimulation zeigte sich bei keiner der beiden Subpopulationen (s. Abb. 13a).

Die IP-10-Produktion war bei beiden Subpopulationen eher schwach ausgeprägt (< 100 pg/ml). Sie war schon konstitutiv vorhanden und durch einen TZR-Stimulus oder TZR-TLR1/2/6-Kostimulus nicht weiter zu steigern. Zu erwähnen sei hier, dass die V δ 1-T-Zellen insgesamt größere Mengen an IP-10 produzierten als die V δ 2-T-Zellen (s. Abb. 13b).

MIP-1 α wurde von beiden Subpopulationen in größeren Mengen freigesetzt (> 100 pg/ml), wobei die konstitutive Produktion ohne Stimulation bei V δ 2-T-Zellen höher war als bei V δ 1-T-Zellen. Die TZR-Stimulation wirkte bei beiden Subpopulationen steigernd auf die Produktion. Eine verstärkt stimulierende Wirkung durch TZR-TLR1/2/6-Stimulus war hier nicht erkennbar (s. Abb. 13c).

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse auf einen kostimulatorischen Effekt von TLR2-Liganden zusätzlich zur TZR-Stimulation auf frisch isolierte $\gamma\delta$ -T-Zellen schließen. Dabei wird die Produktion von drei von sechs getesteten Zytokinen/Chemokinen im Vergleich zu alleiniger TZR-Stimulation verstärkt.

4.2.4 Stimulation von TLR5 mit Flagellin

Flagellin ist als Hauptbestandteil der Geißel beweglicher Bakterien ein typischer bakterieller Ligand, der spezifisch an TLR 5 bindet. Crellin et al. (2005) beschreiben die Expression von TLR5 bei CD4⁺ T-Zellen und regulatorischen T-Zellen in ähnlichem Ausmaß wie bei Monozyten und dendritischen Zellen. Außerdem wirkt der TLR5-Ligand Flagellin regulierend auf die Funktion dieser T-Zellen (Crellin et al., 2005).

Flagellin wird unter anderem von Borrelien gebildet. V δ 1-T-Zellen von Patienten mit einer Lyme-Borreliose reagieren auf Borrelien-Antigene mit Proliferation (Glatzel, 2002). Es stellte sich also die Frage, ob diese Aktivierung der Zellen über TLR5 und durch Bindung des Liganden Flagellin erfolgt.

Das in dieser Arbeit verwendete Flagellin stammte aus den Arten *Salmonella typhimurium* und *Bacillus subtilis*. Nach Stimulation der $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulationen mit beiden Sorten Flagellin zeigte sich, dass es in der Reaktion auf die Stimulation kaum einen Unterschied machte, von welcher Bakterienart das Flagellin stammte. Die Stärke der IFN- γ -Produktion war nach Stimulation der Zellen mit Flagellin aus

Salmonella typhimurium vergleichbar hoch wie nach Stimulation mit Flagellin aus *Bacillus subtilis* (V δ 2-T-Zellen s. Abb. 14, V δ 1-T-Zellen nicht dargestellt).

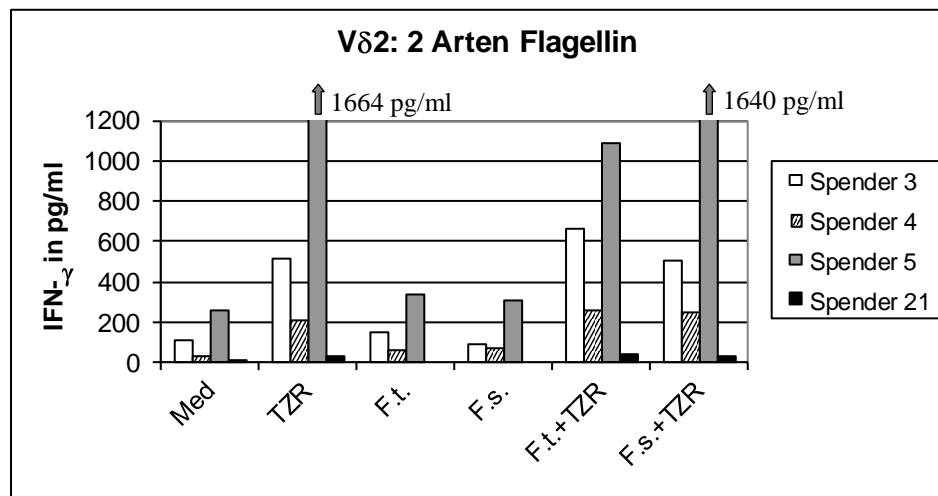


Abbildung 14: **Bei der Stimulation von V δ 2-T-Zellen über TLR5 macht es in der induzierten IFN- γ -Produktion keinen Unterschied, wenn das Flagellin verschiedener Bakterienarten verwendet wird.**

Nach Separation der V δ 2-T-Zellen wurden diese in Medium kultiviert (Med) oder über den TZR bzw. den TLR5 stimuliert. Die TLR5-Stimulation erfolgte mit Flagellin zweier verschiedener Bakterienarten, einerseits mit Flagellin aus *Salmonella typhimurium* (F.t.), andererseits mit Flagellin aus *Bacillus subtilis* (F.s.) (jeweils 1 μ g/ml). Einige Zellen wurden gleichzeitig über den TZR und den TLR5 stimuliert, ebenfalls mit Flagellin beider genannten Bakterienarten. Die IFN- γ -Konzentration in den Überständen wurde mit einem ELISA bestimmt, die Werte des Spenders 5 für TZR und F.s.+TZR betragen geringfügig über 1600 pg/ml.

Zusätzlich wurde die IFN- γ -Produktion der beiden Subpopulationen nach TLR5-Stimulation bzw. nach kombinierter TZR-TLR5-Stimulation verglichen (s. Abb. 15). Bei den V δ 1-T-Zellen war nach TZR-Stimulation eine gegenüber den unstimulierten Zellen signifikant gesteigerte IFN- γ -Produktion sichtbar. Nach alleiniger TLR5-Stimulation kam es ebenfalls zu einer signifikanten Steigerung der IFN- γ -Produktion. Die IFN- γ -Konzentration war dabei ähnlich hoch wie nach TZR-Stimulation. Die kombinierte TZR-TLR5-Stimulation bewirkte eine weitere Steigerung der IFN- γ -Produktion, die im Vergleich zur TZR-stimulierten Gruppe signifikant und im Vergleich zur Mediumkontrolle hoch signifikant war (s. Abb. 15A).

Bei den V δ 2-T-Zellen war die IFN- γ -Konzentration mit oder ohne Stimulation insgesamt höher als bei den V δ 1-T-Zellen. Nach TZR-Stimulation kam es zu einer hoch signifikanten Steigerung der IFN- γ -Produktion im Vergleich zur Mediumkontrolle. Auch die IFN- γ -Konzentration nach isolierter TLR5-Stimulation war gegenüber den unstimulierten Zellen signifikant erhöht, aber nicht so hoch wie nach

TZR-Stimulation. Nach kombinierter TZR-TLR5-Stimulation kam es bei den V δ 2-T-Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle hoch signifikant gesteigerten IFN- γ -Produktion. Die IFN- γ -Konzentration war gegenüber den TZR-stimulierten Zellen aber wenig erhöht (s. Abb. 15B).

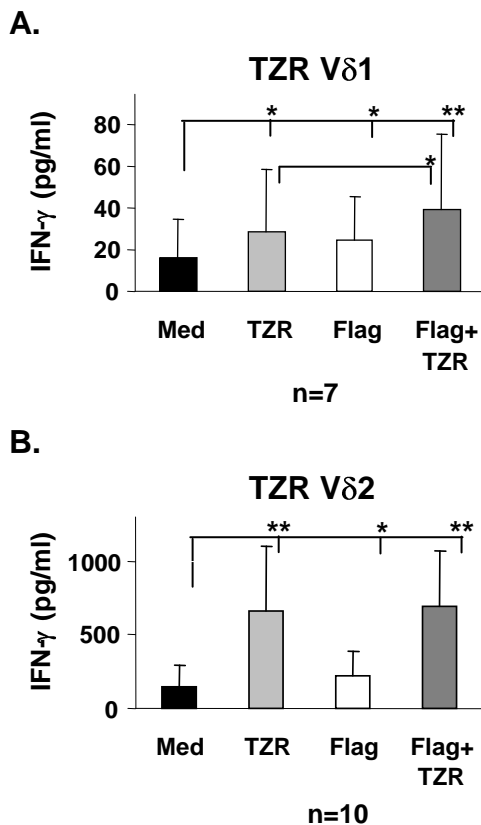


Abbildung 15:

V δ 1-T-Zellen reagieren im Gegensatz zu V δ 2-T-Zellen auf die kombinierte TZR-TLR5-Stimulation mit einer Steigerung der IFN γ -Produktion im Vergleich zu TZR-stimulierten Zellen.

Nach Trennung der $\gamma\delta$ -T-Zellen in ihre Subpopulationen wurden die Zellen in Medium kultiviert (Med) oder über den TZR bzw. den TLR5 mit 1 μ g/ml Flagellin stimuliert (Flag).

Einige Zellen wurden gleichzeitig über den TZR und den TLR5 stimuliert (Flag+TZR). Die IFN- γ -Konzentrationen wurden aus den Überständen mit Hilfe eines ELISA bestimmt.

Die Werte ergeben sich aus einem Mittelwert \pm Standardabweichung aus sieben bzw. zehn Experimenten. *p < 0,05, **p < 0,01.

Die Produktion weiterer Zytokine/Chemokine nach TLR5-Stimulation wurde nicht weiter untersucht.

4.3 Einfluss der Markierung mit Antikörpern auf die Zytokin-Freisetzung

Um $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulationen innerhalb der PBMZ kenntlich zu machen, wurden diese mit anti-TZR-mAk markiert (s. 3.1.5.2). Es stellte sich die Frage, ob die Antikörper-Markierung eine Voraktivierung der Zellen bedingen könnte. In den ersten Experimenten wurden alle Zellen mit dem anti- $\gamma\delta$ -TZR-mAk (Klon 11F2) und nur die V δ 2-Subpopulation mit einem anti-V δ 2-mAk markiert. Die zusätzliche Markierung von V δ 2-T-Zellen könnte zu einer verstärkten Aktivierung im Vergleich zu den einfach markierten V δ 1-T-Zellen führen. Um einen möglichen Effekt einer Markierung auf eine zusätzliche Aktivierung zu untersuchen, wurde in weiteren Experimenten die

eine Hälfte der V δ 1-Subpopulation nach dem Sortieren mit einem anti-V δ 1-mAk markiert und die andere Hälfte nicht. Nach Stimulation mit dem anti-V δ 1-mAk wurde die IFN- γ -Produktion der beiden unterschiedlich behandelten V δ 1-Populationen verglichen. Es ergab sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den einfach markierten und doppelt markierten V δ 1-T-Zellen (s. Abb. 16).

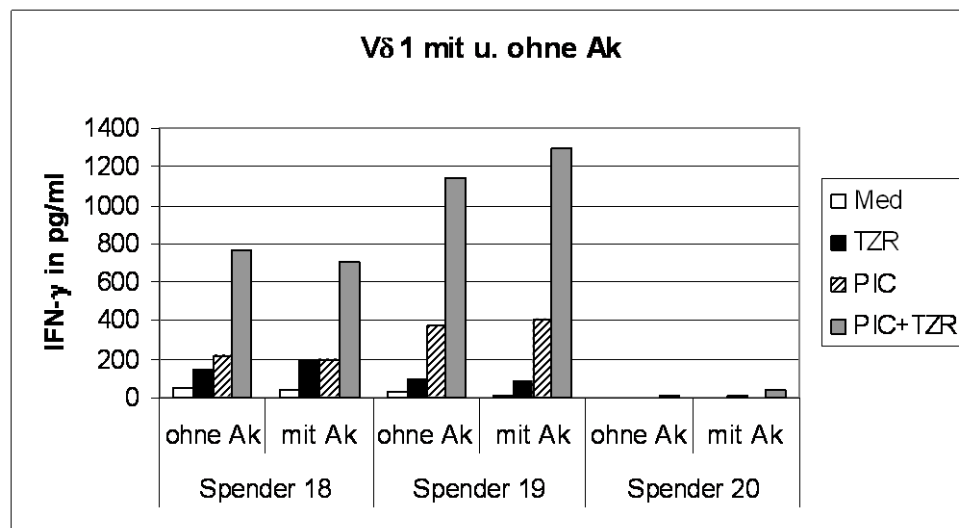


Abbildung 16: **Die Markierung von V δ 1-T-Zellen mit anti-V δ 1-mAk hat keinen Einfluss auf die IFN- γ -Produktion der Zellen.**

Nach der Separation der V δ 1-T-Zellen wurde die eine Hälfte der Zellen mit einem anti-V δ 1-mAk (mit Ak) markiert, die andere Hälfte wurde nicht markiert (ohne Ak). Anschließend wurden die Zellen in Medium kultiviert (Med) oder über den TZR oder den TLR3 mit Poly(I:C) (PIC) stimuliert. Einige Zellen wurde gleichzeitig über den TZR und TLR3 stimuliert (PIC+TZR). Die IFN- γ -Konzentration wurde mit Hilfe eines ELISA bestimmt. Es werden die Ergebnisse aus Experimenten mit den Zellen drei verschiedener Spender dargestellt.

4.4 Nachweis von Caspase-Aktivierung als Zelltod-Parameter

Bei frisch isolierten, naiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen kommt es normalerweise nicht zum Zelltod. Nach Stimulation dieser Zellen über den TZR kommt es zunächst zur Proliferation, nach einer Restimulation über den TZR kann später Apoptose eingeleitet werden, um eine überschießende Immunantwort zu verhindern (Brenner et al., 2008).

Im Blut vorhandene V δ 2-T-Zellen exprimieren alle CD45RO. Sie weisen also einen „memory“ Phänotyp auf und sind durch einen vorigen Antigen-Kontakt voraktiviert (Eberl et al., 2002). In voraktivierten $\gamma\delta$ -T-Zellen könnte Zelltod ausgelöst werden.

Bisher ist beschrieben, dass bei $\gamma\delta$ -T-Zelllinien durch ein TZR-CD3-Signal und den Zusatz von IL-2 Apoptose ausgelöst wird (Janssen et al., 1991).

In Tumorzellen können TLR-Liganden Apoptose direkt auslösen, z.B. durch Stimulation über TLR3 (Salaun et al., 2006) oder über TLR7/8 (Smits et al., 2008), aber auch das Überleben von Tumorzellen und ihre Proliferation fördern (Bohnhorst et al., 2006).

In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob TLR-Liganden auch in $\gamma\delta$ -T-Zellen Apoptose auslösen können.

Als Indikator für eine gesteigerte Apoptose-Rate kann die Bestimmung der Caspase-Aktivität genutzt werden. In dieser Arbeit wurden unstimulierte $\gamma\delta$ -T-Zellen, Zellen nach TZR-Stimulation, Zellen nach TLR3-Stimulation und Zellen nach kombinierter TZR- und TLR3-Stimulation in ihrer Caspase-Aktivität verglichen. Bei zwei von vier Spendern machte es kaum einen Unterschied, ob und wie die Zellen stimuliert worden waren. Weder bei der V δ 1- noch bei der V δ 2-T-Zellsubpopulation waren Unterschiede in der Caspase-Aktivität sichtbar (s. Abb 17, Spender A und B).

Bei zwei weiteren Spendern kam es in der V δ 1-Subpopulation nach TLR3-Stimulation zu einer verstärkten Caspase-Aktivität (s. Abb. 17, Spender C und D). Diese Zellen zeigten nach kombinierter TZR-TLR3-Stimulation eine weniger starke Caspase-Aktivität als nach alleiniger TLR3-Stimulation. In der V δ 2-Subpopulation kam es bei zwei Spendern zur verminderten Caspase-Aktivität nach Stimulation im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (s. Abb. 17, Spender C und D). Insgesamt lässt sich keine für alle Spender zutreffende Aussage über den Einfluss der Stimulation auf die Apoptose-Rate machen.

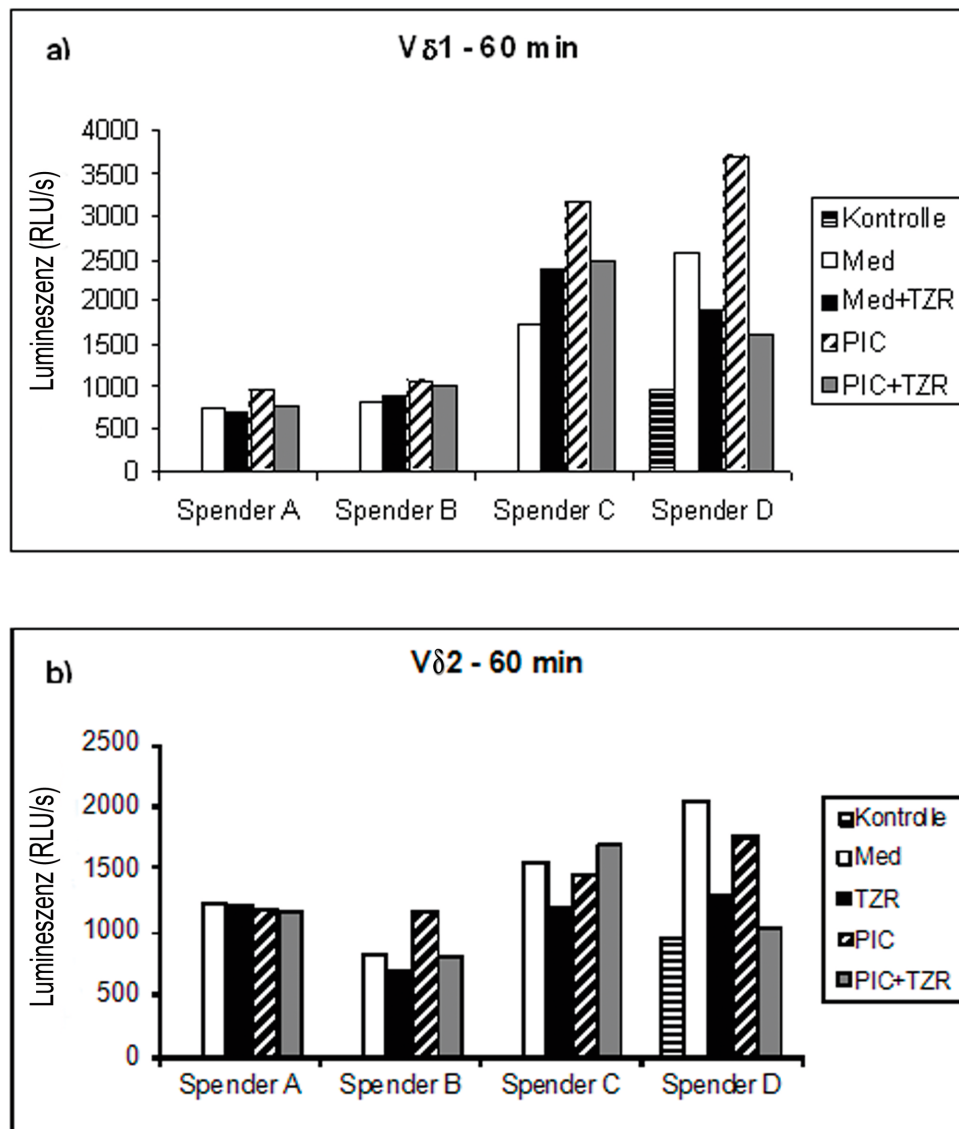


Abbildung 17:

Bestimmung der Caspase-Aktivität anhand der Lumineszenz bei a) Vδ1- und b) Vδ2-T-Zellen 60 min nach Zugabe des Reagenz bei 4 verschiedenen Spendern. Das Reagenz wurde ohne Zellen verwendet (Kontrolle) oder zu den unstimulierten Zellen gegeben (Med), bzw. zu den Zellen nach TZR- Stimulation (TZR), zu den Zellen nach TLR3-Stimulation mit Poly(I:C) (PIC) und zu den Zellen nach TZR-TLR3-Kostimulation (PIC+TLR).

5. Diskussion

Toll-like Rezeptoren sind Muster-Erkennungsrezeptoren der angeborenen Abwehr. Die Toll-Proteine wurden erstmals bei der Fruchtfliege *Drosophila* entdeckt, wo sie eine Rolle bei der embryonalen dorso-ventralen Entwicklung spielen und zusätzlich der Abwehr von Pilzinfektionen dienen. In späteren Untersuchungen wurden auch bei Wirbeltieren verschiedene Toll-like Rezeptoren gefunden (Takeda u. Akira, 2005). Beim Menschen sind die TLR1-10 nachgewiesen worden und bei der Maus die TLR1-9 und TLR11-13 (Kawai u. Akira, 2010).

Werling und Jungi (2003) beschrieben, dass APZ wie dendritische Zellen und Makrophagen TLR exprimieren. Nach der Bindung von TLR-Liganden, z.B. bei einer Infektion, wird die Zelle aktiviert, die TLR-Expression verstärkt und freie Radikale als erste Abwehr zur Abtötung von Erregern freigesetzt. Außerdem wird durch die verstärkte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und eine vermehrte Expression kostimulatorischer Moleküle die adaptive Immunität angeregt. Dendritische Zellen werden über die verstärkte Expression von Chemokinrezeptoren dazu aktiviert, vermehrt zu Lymphknoten zu wandern, wo sie die T-Zellen direkt stimulieren (Werling u. Jungi, 2003).

Hornung et al. (2002) untersuchten die Expression der TLR-mRNA bei unstimulierten humanen PBMZ und beschreiben die Expression von TLR1 bis 10 in Zellen des angeborenen Immunsystems (dendritischen Zellen, Monozyten und NK-Zellen). Des Weiteren konnten sie zeigen, dass auch B- und T-Zellen (Zellen des erworbenen Immunsystems) TLR1-10-mRNA exprimieren. TLR1 und TLR5 werden laut Hornung et al. auf T-Zellen besonders stark exprimiert (Hornung et al., 2002).

Die Arbeitsgruppe, in der vorliegende Arbeit angefertigt wurde, konnte zeigen, dass auch humane $\gamma\delta$ -T-Zellen TLR1-10-mRNA in unterschiedlichem Ausmaß exprimieren (Beetz et al., 2008, Pietschmann et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass TLR1- und -2-mRNA stärker exprimiert werden als die mRNA von TLR3, 6 und 7 (Beetz et al., 2008). Der Vergleich der unterschiedlichen $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulationen zeigte, dass V δ 2-T-Zellen die genannten TLR stärker exprimieren als V δ 1-T-Zellen (Pietschmann et al., 2009).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Expression in humanen $\gamma\delta$ -T-Zellen innerhalb der PBMZ für einige TLR auch auf Proteinebene mehr oder weniger belegt werden. TLR1-mRNA beispielsweise war in der Arbeitsgruppe der vorliegenden

Arbeit immer deutlich detektierbar, während das Protein in dieser Arbeit nur bei einigen Spendern schwach auf der Oberfläche der $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimiert wurde.

TLR2 dagegen wurde bei beiden Subpopulationen auf der Zelloberfläche detektiert.

Hedges (2005) und Deetz (2006) beschreiben Schwierigkeiten beim Nachweis von TLR2 auf der Zelloberfläche von humanen $\gamma\delta$ -T-Zelllinien.

Hedges et al. konnten die TLR2,3,4,6,7 und 8 auf humanen $\gamma\delta$ -T-Zelllinien und bovinen frisch isolierten $\gamma\delta$ -T-Zellen per Microarray Genchip-Analyse nicht bzw. nur in schwacher Ausprägung detektieren. Sie beschreiben außerdem eine schlechte Markierung der Rezeptoren auf humanen $\gamma\delta$ -T-Zelllinien durch kommerziell erworbene monoklonale Antikörper, wobei der Klon der verwendeten mAk nicht näher genannt wird.

Deetz nutzte FTIC-konjugierte TLR2-Antikörper des Klons TL2.1. Er begründet die schlechte Nachweisbarkeit von TLR2 per Antikörper-Färbung auf Zelloberflächen von humanen, mit Pam3Cys voraktivierten $\gamma\delta$ -T-Zelllinien mit dem schnellen Abbau dieses Rezeptors. Dass er aber vorhanden sein muss, werde durch die Reaktion der Zellen auf Stimulation mit Pam3Cys in Kombination mit TZR-Stimulation im Sinne einer erhöhten IFN- γ -Produktion sichtbar. In der vorliegenden Arbeit wurde ein APC-konjugierter TLR2-mAk desselben Klons wie bei Deetz verwendet (Klon TL2.1, s. 3.1.5.3a), womit der Nachweis von TLR2 auf der Oberfläche von frischen $\gamma\delta$ -T-Zellen gelang. Bei der Methode der Oberflächenfärbung macht es keinen Unterschied, mit welchem Fluoreszenz-Farbstoff der mAk markiert ist. Eine mögliche Erklärung für das Misslingen des Nachweises von TLR2 durch Deetz et al. wäre der Einsatz weiterer Antikörper, die den TLR2-mAk zu stark verdünnen könnten. In der Arbeitsgruppe, in der vorliegende Arbeit erstellt wurde, sind zwei Versionen der Markierung erprobt worden. Der Nachweis von TLR2 gelang, wenn die TLR2-mAk-Markierung zuerst durchgeführt wurde. Nach zweimaligen Waschen wurden die Zellen erst im zweiten Färbeprozess mit weiteren Anti-TZR $\gamma\delta$ -mAk markiert. In dieser Arbeitsgruppe konnte außerdem gezeigt werden, dass nach alleiniger TLR-Stimulation die TLR-Expression auf frisch isolierten $\gamma\delta$ -T-Zellen hochreguliert wird und dass die zusätzliche Gabe von TLR-Liganden die TLR-Expression verstärkt (Wesch, 2006 und unveröffentlichte Daten).

TLR6 wurde in der vorliegenden Arbeit mit intrazellulärer Färbung nachgewiesen, obwohl er eigentlich auf der Oberfläche liegt. Weil der entsprechende mAk an der intrazellulären Domäne des TLR6 bindet, kann er nur nach Permeabilisation der

Zellmembran zu seinem Bindungsort gelangen und wird entsprechend intrazellulär abgebildet.

TLR4 konnte in dieser Arbeit in humanen, frisch isolierten $\gamma\delta$ -T-Zellen nicht nachgewiesen werden, was zur Hypothese von Cui et al. (2009) passt, die vermuteten, dass nur aktivierte $\gamma\delta$ -T-Zellen TLR2 und 4 gemeinsam exprimieren können, wozu der direkte Zellkontakt zu dendritischen Zellen notwendig sei. Die durch die Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen hervorgerufene Freisetzung von TNF- α und IFN- γ fördere wiederum die Reifung der dendritischen Zellen und außerdem die Aktivität von Makrophagen. Bei Mäusen konnte TLR4 auf der Oberfläche von zirkulierenden, peritonealen und Haut- $\gamma\delta$ -T-Zellen nicht nachgewiesen werden, aber nach Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen durch z.B. Verbrennungen wurde TLR4 auf dermalen $\gamma\delta$ -T-Zellen hochreguliert (Schwacha et al., 2008, Martin et al., 2009).

TLR5 konnte in der Arbeitsgruppe der vorliegenden Arbeit auf mRNA-Ebene kaum nachgewiesen werden. Für den Nachweis des entsprechenden Proteins stand kein passender mAk zur Verfügung. Gibbons et al. (2009), die humane $\gamma\delta$ -T-Zellen von Frühgeborenen, reifen Neugeborenen und Erwachsenen untersuchten, beschreiben die Expression von TLR5-mRNA in $\gamma\delta$ -T-Zellen.

Für TLR7 stand zum Zeitpunkt der Anfertigung der vorliegenden Arbeit nur ein unkonjugierter anti-TLR7-mAk zur Verfügung, der sich aus folgenden Gründen als ungeeignet erwies: Sowohl bei der Markierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen innerhalb von PBMZ als auch von magnetisch isolierten $\gamma\delta$ -T-Zellen sind die Zellen auf der Oberfläche mit einem anti-TZR $\gamma\delta$ -mAk markiert. Der Oberflächenmarkierung kann sich eine intrazelluläre Färbung anschließen. Stehen für die intrazelluläre Färbung allerdings nur unkonjugierte Ak zur Verfügung, ist es notwendig, einen Fluorochrom markierten Zweit-Ak zu verwenden, welcher dann auch an die anti-TZR $\gamma\delta$ -mAk binden würde. Zur Vermeidung dieses unspezifischen Effekts würde man nur direkt mit Fluorochrom markierte Ak zur intrazellulären Färbung einsetzen. In späteren Experimenten der Arbeitsgruppe wurde der anti-TLR7-mAk mit einem Fluorochrom-Markierungsset direkt markiert und TLR7 innerhalb der $\gamma\delta$ -T-Zellen detektiert (unveröffentlichte Daten). Gibbons et al., die $\gamma\delta$ -T-Zellklone aus menschlichem Blut generierten, konnten bei Zellen aus Frühgeborenen eine schwächere Expression von TLR7-mRNA als bei Zellen von reifen Neugeborenen und Erwachsenen feststellen

(Gibbons et al., 2009). Fang et al. (2010) konnten bei Mäusen TLR7 in $\gamma\delta$ -T-Zellen aus der Milz nachweisen.

Die intrazellulär im Endosom gelegenen TLR3 und 8 waren in der vorliegenden Arbeit als Protein deutlich nachweisbar (s. Abb. 2). TLR3 war bei Experimenten der Arbeitsgruppe, in der diese Arbeit erstellt wurde, auf mRNA-Ebene nur schwach sichtbar. Bei frisch isolierten $\gamma\delta$ -T-Zellen war TLR3 als Protein nicht auf der Zelloberfläche sichtbar, wurde aber nach 24 Stunden TZR-Stimulation dort exprimiert (Wesch et al., 2006). TLR8 war in Experimenten der Arbeitsgruppe dieser Arbeit auf mRNA-Ebene teilweise sehr schwach sichtbar oder im Vergleich zu anderen nicht sichtbar. Aber ein Minimum an mRNA reicht aus, damit das entsprechende Protein synthetisiert wird. Hedges et al. (2005) konnten TLR8-mRNA auf $\gamma\delta$ -T-Zellen von Rindern in schwacher Ausprägung nachweisen.

Die Steigerung der IFN- γ -Freisetzung als Zeichen einer Aktivierung der Zellen ließ sich in vorliegender Arbeit nach Stimulation mit Poly(I:C) in Kombination mit TZR-Stimulus bei beiden $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen feststellen. Dies weist auf eine gesteigerte Effektorfunktion bei V δ 1- und V δ 2-T-Zellen durch den TLR3-Liganden Poly(I:C) hin. Nach Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen über TLR3 in Kombination mit TZR-Stimulus wurde bei beiden Subpopulationen auch die Produktion von TNF- α , MIP-1 α und RANTES und in geringer Menge auch die IL-8-Produktion gesteigert. Bei den V δ 2-T-Zellen kam es zusätzlich zu einer verstärkten GM-CSF-Freisetzung.

Bei weiteren Experimenten der Arbeitsgruppe der vorliegenden Arbeit wurde nach kombinierter TZR-TLR3-Stimulation von frisch isolierten $\gamma\delta$ -T-Zellen außerdem die Steigerung der Expression von CD69 sichtbar (Wesch et al., 2006). CD69 wird bei jeder Aktivierung von Zellen hochreguliert, was auch durch den Vorgang der Isolation bzw. Separation der Zellen verursacht werden kann.

Da TLR3 ein Rezeptor für virale DNA ist und eine antivirale Reaktion nach Aktivierung notwendig erscheint, ist die Ausschüttung von TH1-Zytokinen wie IFN- γ und TNF- α sinnvoll, um eine allgemeine Entzündungsreaktion, die Differenzierung zu zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTL) und die Aktivierung von Makrophagen zur Bekämpfung der Viren bzw. der virusinfizierten Zellen zu fördern. GM-CSF fördert ebenfalls die Reifung und Proliferation von Makrophagen (Biwa et al., 2000), MIP-1 α lockt weitere ZTL an, und RANTES und IL-8 fördern den Einstrom weiterer Immunzellen in infiziertes Gewebe.

Fang et al. (2010) beschreiben, dass mit dem TLR3-Liganden Poly(I:C) stimulierte $\gamma\delta$ -T-Zellen aus der Milz von Mäusen ebenfalls eine verstärkte Produktion von IFN- γ und TNF- α zeigen.

Gibbons et al. (2009) konnten ebenfalls die gesteigerte IFN- γ -Produktion von humanen kurzzeitig stimulierten $\gamma\delta$ -T-Zelllinien und -klonen nach kombinierter TZR-TLR3-Stimulation nachweisen. Bei $\gamma\delta$ -T-Zelllinien, die über einen längeren Zeitraum stimuliert wurden, wird TLR3 nicht auf der Oberfläche exprimiert und es kommt nach TZR-TLR3-Stimulation nicht zur gesteigerten IFN- γ -Produktion (Kunzmann et al., 2004). Der Unterschied zwischen kurzzeitig stimulierten $\gamma\delta$ -T-Zellen und langfristig stimulierten $\gamma\delta$ -T-Zelllinien in der Oberflächen-TLR3-Expression ist nicht ganz geklärt. Die unterschiedliche Reaktion auf die kombinierte TZR-TLR3-Stimulation lässt sich vielleicht durch den unterschiedlichen Aktivierungsstatus erklären. Außerdem unterscheiden sich kurz stimulierte $\gamma\delta$ -T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zelllinien in der Abhängigkeit der frisch isolierten $\gamma\delta$ -T-Zellen von IL-2, welches sie nicht selbst produzieren können. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass V δ 2-T-Zellen nach Stimulation mit dem TLR3-Liganden Poly(I:C) unter Zugabe von IL-2 eine genauso stark gesteigerte IFN- γ -Produktion wie nach TZR-TLR3-Kostimulation zeigen (s. Abb. 4). Es ist möglich, dass der Einsatz des TLR3-Liganden Poly(I:C) die Zugabe von IL-2 bei frisch isolierten V δ 2-T-Zellen ersetzen könnte.

Nach TZR-Stimulation mit zusätzlichem Kostimulus durch die TLR1/2/6-Liganden Pam₂CSK4, Pam₃CSK4 und FSL-1 war bei den V δ 2-T-Zellen eine gesteigerte IFN- γ -Produktion erkennbar. Die Stimulation der TLR1/2 und -2/6-Heterodimere zusätzlich zum TZR-Stimulus, vor allem mit einer Kombination mehrerer TLR2-Liganden, induzierte bei den V δ 2-T-Zellen nicht nur eine gesteigerte IFN- γ -Produktion, sondern auch eine vermehrte Freisetzung von RANTES und IL-8. Obwohl die V δ 1-T-Zellen bei dieser Behandlung weniger IFN- γ produzierten, setzten sie ähnlich hohe Mengen an RANTES frei wie die V δ 2-T-Zellen und etwas geringere Mengen an IL-8. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Erkennung bakterieller Bestandteile über die TLR1,2 und 6 die vermehrte Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen auslöst, die eine allgemeine Entzündungsreaktion verstärken und die Rekrutierung anderer Immunzellen, insbesondere von Granulozyten zur Bakterienabwehr veranlassen. Kapp et al. beschrieben 1994, dass die Chemokine RANTES und MIP-1 α bei humanen eosinophilen Granulozyten die Produktion von Sauerstoffradikalen

induzieren, wodurch Bakterien abgetötet werden. Die Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES können aber auch weitere $\gamma\delta$ -T-Zellen anlocken, wie Roth et al. (1998) durch transendotheliale Chemotaxisversuche herausgefunden haben.

Hedges et al. (2005) stimulierten humane $\gamma\delta$ -T-Zelllinien und bovine frisch isolierte $\gamma\delta$ -T-Zellen mit LPS als TLR2- und 4-Ligand und Peptidoglykan als TLR2-Ligand ohne TZR-Stimulation und ohne Einfluss von APZ. Sie konnten eine gesteigerte Produktion von IFN- γ , TNF- α , MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL-8 und GM-CSF auf mRNA-Ebene bzw. durch direkte Messungen der Proteinkonzentrationen feststellen. Sie beschrieben eine leichte Steigerung der Expression von MIP-1 α - und MIP-1 β -mRNA bei humanen und eine deutliche Steigerung von MIP-1 α - und RANTES-mRNA bei bovinen $\gamma\delta$ -T-Zellen. Die schwache Steigerung der Chemokin-mRNA bei humanen $\gamma\delta$ -T-Zelllinien lässt sich durch den fehlenden TZR-Stimulus begründen. Unterschiede in der Zytokin-Expression zwischen einzelnen Individuen (verschiedene Kälber) erklärt Hedges mit individuellem Kontakt zu verschiedenen Umwelteinflüssen.

In der vorliegenden Arbeit zeigten die humanen, frisch isolierten $\gamma\delta$ -T-Zellen keine erhöhte Zytokin-/Chemokinproduktion nach alleiniger Stimulation mit einzelnen TLR2-Liganden. Bei der Verwendung mehrerer TLR2-Liganden gleichzeitig kam es bei der V δ 2-Subpopulation zur erhöhten IFN- γ -Produktion und bei beiden Subpopulationen zur erhöhten IL-8-Produktion nach alleiniger TLR1/2/6-Stimulation. Die Produktion der Zytokine/Chemokine RANTES, TNF- α , IP-10 und MIP-1 α blieb durch TLR1/2/6-Stimulation unbeeinflusst. Dies wäre durch den Unterschied zwischen frisch isolierten $\gamma\delta$ -T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zelllinien erklärbar. $\gamma\delta$ -T-Zelllinien reagieren durch die Expansion der Zellen in Kultur mit Hilfe verschiedener Stimuli anders als frisch isolierte $\gamma\delta$ -T-Zellen.

Lubick et al. (2006) stimulierten $\gamma\delta$ -T-Zellen aus Rindern mit dem TLR2-Liganden Lipoteichonsäure (LTA). Es kam ohne zusätzliche TZR-Stimulation zur gesteigerten MIP-1 α -Produktion. Außerdem wurde die Expression von CD36 auf bovinen $\gamma\delta$ -T-Zellen festgestellt. CD36 ist ein integrales Membranglykoprotein und wird häufig auf APZ exprimiert. Es dient als Ko-Rezeptor von TLR2 und ist für die Erkennung von LTA notwendig. Die schwache Reaktion humaner $\gamma\delta$ -T-Zellen auf die alleinige TLR2-Stimulation lässt sich möglicherweise mit dem Fehlen von CD36 auf humanen $\gamma\delta$ -T-Zellen erklären.

Trotz Nachweis von TLR8 auf Proteinebene konnten die Zellen durch Inkubation mit ssRNA (ssRNA 40 und ssPolyU) nicht zu erhöhter IFN- γ -Produktion gebracht werden. Da TLR8 intrazellulär vorliegt, muss der entsprechende Ligand durch die Zellmembran transportiert werden, bevor er binden kann. Möglicherweise war dieser Transport nicht möglich, was die Reaktion auf die Bindung verhindert hat. Ghosh (2006), der humane PBMZ auf TLR-Expression hin untersucht hat, beschreibt auch das Phänomen der schlechten Membrangängigkeit von TLR-Liganden, nämlich von Poly(I:C), das die bei ihm fehlende IFN- γ -Produktion bei PBMZ nach Stimulation mit Poly(I:C) erkläre. Peng et al. (2007) konnten zeigen, dass die immunsuppressive Funktion humaner V δ 1-T-Zellen, die Brustkrebsgewebe infiltrieren, durch den Einsatz von TLR8-Liganden gehemmt werden kann. TLR7- und TLR9-Liganden führten in den Experimenten von Peng et al. nicht zu diesem hemmenden Effekt.

Obwohl TLR7 in Form von mRNA nur schwach und als Protein aufgrund fehlender Antikörper in vorliegender Arbeit bei $\gamma\delta$ -T-Zellen nicht nachweisbar war, konnten die V δ 2-T-Zellen mithilfe des Liganden Imiquimod in Kombination mit TZR-Stimulation leicht aktiviert werden. Zu bedenken ist aber, dass dieses Ergebnis nur bei einem Spender sichtbar war (s. Abb. 8). Die Arbeitsgruppe, in der die vorliegende Arbeit angefertigt wurde, berichtet über eine verstärkte Zytotoxizität von $\gamma\delta$ -T-Zellen, wenn diese zusätzlich zum TZR-Stimulus mit dem TLR3-Liganden Poly(I:C) oder dem TLR7-Liganden Imiquimod vorbehandelt worden seien (Shojaei et al. 2009 und unpublizierte Daten). Diese Ergebnisse lassen auf die TLR7-Expression bei $\gamma\delta$ -T-Zellen und eine Aktivierung durch TLR7-Liganden schließen.

Auf die isolierte TLR5-Stimulation mit Flagellin reagierten die V δ 1-T-Zellen im Gegensatz zu den V δ 2-T-Zellen mit erhöhter IFN- γ -Produktion. Dabei war die IFN- γ -Konzentration ähnlich hoch wie nach TZR-Stimulation. Durch kombinierte TZR-TLR5-Stimulation konnte die IFN- γ -Produktion bei den V δ 1-T-Zellen noch gesteigert werden. Die V δ 2-T-Zellen zeigten zwar eine erhöhte IFN- γ -Produktion nach TZR-Stimulation, die aber durch zusätzliche TLR5-Stimulation nicht gesteigert werden konnte. Nach isolierter TLR5-Stimulation kam es bei den V δ 2-T-Zellen zu keiner gesteigerten IFN- γ -Produktion. Ob die unterschiedlich starke Reaktion der beiden Subpopulationen auf den TLR5-Liganden Flagellin mit einer unterschiedlichen Expression des TLR5 einhergeht, war bislang aufgrund des Fehlens eines passenden anti-TLR5-mAk nicht zu klären. Weiterhin wäre die Induktion weiterer

Zytokine/Chemokine nach TLR5-Stimulation bei beiden $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulationen zu erforschen.

Eine mögliche Erklärung für die stärkere Reaktion der V δ 1-T-Zellen auf den TLR5-Liganden Flagellin könnte eine spezifische Erkennung durch V δ 1-T-Zellen sein, die bei V δ 2-T-Zellen fehlt bzw. schwächer ausgeprägt ist. Es wäre denkbar, dass aus dem Darm stammende oder für den Darm bestimmte V δ 1-T-Zellen, welche häufiger begeißelte Bakterien erkennen müssen, im Blut zirkulieren. Da die V δ 2-T-Zellen hauptsächlich im Blut lokalisiert sind, kommen sie seltener mit begeißelten Bakterien in Kontakt. Eine Expression von TLR5 bzw. die Reaktion auf TLR5-Liganden ist deshalb nicht so sehr notwendig wie bei den V δ 1-T-Zellen. TLR5 spielt klinisch bei der Entwicklung von chronisch entzündlichen Darmerkrankung eine Rolle. Vijay-Kumar et al. haben 2007 herausgefunden, dass Mäuse mit einem TLR5-Defekt eine spontane Kolitis entwickeln.

Crellin et al. (2005) untersuchten die Expression von TLR5 bei T-Helferzellen und regulatorischen T-Zellen. Sie beschrieben, dass diese Zellen nach TZR-Aktivierung die TLR5-Expression auf der Zelloberfläche nach 12 bis 24 Stunden vorübergehend hochregulierten und danach (48 bis 72 Stunden) wieder verminderten. Außerdem konnten die T-Zellen durch die Stimulation mit Flagellin zusätzlich zur Aktivierung mit einem CD3-Antikörper zur verstärkten Proliferation und IL-2-Ausschüttung angeregt werden. Crellin et al. schließen daraus auf einen kostimulatorischen Effekt von TLR5 auf CD4⁺ T-Zellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der zugehörigen Arbeitsgruppe zeigen, dass die V δ 1- und die V δ 2-Subpopulation der humanen, frisch isolierten $\gamma\delta$ -T-Zellen eine vergleichbare TLR-Expression auf mRNA- und auf Proteinebene aufweisen. Die mRNA der TLR1,2,3,6 und 7 konnten in beiden Subpopulationen nachgewiesen werden (Pietschmann et al., 2009). Auf Proteinebene wurde die Expression der TLR2,3 und 6 ersichtlich. Deutliche Abweichungen gab es bei den TLR1 und 8: Trotz starker Expression des TLR1 auf mRNA-Ebene, war dieser TLR als Protein nur bei einigen wenigen Spendern sichtbar. TLR8 war umgekehrt als mRNA nicht nachweisbar, dafür aber als Protein bei beiden Subpopulationen deutlich sichtbar. Aus diesem Grund sollten bei Betrachtung der Ergebnisse funktioneller Experimente immer beide Nachweismöglichkeiten berücksichtigt werden.

Bei allen funktionellen Experimenten wird sichtbar, dass die Subpopulationen der $\gamma\delta$ -T-Zellen unterschiedliche Muster der Zytokinfreisetzung zeigen. Bei beiden Subpopulationen wird die Zytokin-/Chemokinproduktion durch Stimulation mit TLR2-, TLR3- und TLR5-Liganden zusätzlich zur TZR-Stimulation gesteigert. Beide Subpopulationen produzieren ähnliche Konzentrationen von RANTES, MIP-1 α und IL-8, aber die Subpopulation der V δ 2-T-Zellen produziert eine zehnfach höhere IFN- γ -Konzentration als die V δ 1-T-Zellen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die im Blut vorherrschenden V δ 2-T-Zellen eine proinflammatorische Funktion haben, weshalb sie nach Pathogenerkennung IFN- γ freisetzen, um weitere Immunzellen zu aktivieren. Die V δ 1-T-Zellen dagegen, die hauptsächlich in Epithelien/Endothelien zu finden sind, haben eine eher regulatorische Funktion, der eine starke IFN- γ -Produktion entgegenstehen würde.

Cui et al.(2009) haben humane $\gamma\delta$ -T-Zellen aus PBMZ angereichert, indem sie in der nicht adhärenen Fraktion der PBMZ die $\alpha\beta^+$ und CD4 $^+$ T-Zellen mit Dynabeads entfernt haben. Die mit Hilfe von Magnetpartikeln positiv selektierten „ruhenden“ $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden mit Lipid A, einem Bestandteil von LPS, also einem Liganden der TLR2 und 4, inkubiert. Zur Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen war zusätzlich die Anwesenheit von dendritischen Zellen zur Antigen-Präsentation notwendig. Nach Aktivierung produzierten die $\gamma\delta$ -T-Zellen IFN- γ und TNF- α in hohen Konzentrationen, IL-4, IL-5 und IL-10 in niedrigen Konzentrationen, was auf eine vermehrte Differenzierung der Zellen in Richtung TH1-Typ hindeute. Cui et al. beschreiben dabei, dass 80% der V δ 2-T-Zellen, aber nur weniger als 30% der V δ 1-T-Zellen in der Lage waren, IFN- γ zu produzieren.

Kabelitz und Wesch (2003) berichten, dass TH1-polarisierte $\gamma\delta$ -T-Zellen hohe Konzentrationen an MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES produzieren, während die TH2-polarisierten IL-8 freisetzen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine relativ starke Produktion der Zytokine IFN- γ , MIP-1 α und RANTES und eine geringe Produktion von IL-8 bei $\gamma\delta$ -T-Zellen. Die Zytokine/Chemokine IFN- γ , MIP-1 α und RANTES sind ein Hinweis auf eine hauptsächliche Differenzierung der aus dem Blut isolierten $\gamma\delta$ -T-Zellen in Richtung TH1-Typ.

Kress et al. (2005) haben die Veränderungen der Genexpression von Zytokinen, Rezeptoren und Oberflächenmarkern bei humanen V δ 1- und V δ 2-T-Zellen nach TLR-Stimulation untersucht. Sie beschreiben, dass V δ 2-T-Zellen mehr

proinflammatorische und V δ 1-T-Zellen mehr regulatorische Zytokine (z.B. L-Selektin, IL-10, IL-11) bzw. entsprechende Rezeptoren aufweisen, was die Theorie untermauert, dass die Subpopulationen verschiedene Funktionen haben.

Auch Toulon et al. (2009) beschreiben die regulierende Funktion von V δ 1-T-Zellen durch IGF (Insulin like growth factor)-1-Produktion bei der Wundheilung.

Neben der Stimulation der T-Zellen über T-Zell- und Toll-like Rezeptoren ist auch der Einfluss des umgebenden Milieus wichtig für die Differenzierung und somit für die Zytokinproduktion. Wesch et al. (2005) beschrieben verschiedene Zytokinprofile bei $\gamma\delta$ -T-Zellen, je nachdem aus welchem Gewebe die Zellen stammten. $\gamma\delta$ -T-Zellen, die z.B. aus der Synovia von Patienten mit juveniler rheumatoider Arthritis isoliert wurden, hatten ein TH1-Zytokinmuster (Gattarno et al., 1997), während $\gamma\delta$ -T-Zellen aus der Flüssigkeit bronchoalveolärer Lavage von Patienten mit allergischem Asthma eine TH2-Differenzierung aufwiesen (Spinozzi et al., 1995). Wesch et al. konnten außerdem die Differenzierung zum TH1-Typ bzw. TH2-Typ durch die Kultivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen mit Zusatz verschiedener Zytokine und Antikörper fördern.

Während der Durchführung der Experimente in der vorliegenden Arbeit gab es die Vermutung, dass die frisch isolierten $\gamma\delta$ -T-Zellen durch die Methode der Separation mithilfe von Antikörpern, die gegen den TZR gerichtet sind und an diesem binden, voraktiviert sein könnten und deshalb Zytokine produzieren könnten. Das bei einer Aktivierung vermehrt produzierte Zytokin IFN- γ und die meisten anderen Zytokine wurden in allen Experimenten von den unstimulierten Zellen (Negativ-Kontrolle in Medium) in nur sehr geringen Mengen produziert, was gegen eine Voraktivierung spricht. Lediglich RANTES und MIP-1 α wurden von V δ 2-T-Zellen auch konstitutiv, d.h. ohne gewollte Stimulation produziert. Wesch et al. (2005) beschrieben ebenfalls eine konstitutive Chemokinproduktion bei V δ 2-T-Zelllinien, nämlich die von RANTES und MIP-1 β . Nach Stimulation dieser Zellen wurden außerdem IL-13 und GM-CSF produziert (Wesch et al., 2005). Die konstitutive Zytokin-/Chemokinproduktion unterstützt die These, dass frisch isolierte $\gamma\delta$ -T-Zellen nie ganz ruhend sind, weil die Isolation und Separation der Subpopulationen immer einen gewissen Stimulus darstellt. Außerdem stammen die Zellen aus einem lebenden Organismus, der ständig mit Fremdproteinen in Kontakt kommt.

Die Ergebnisse der Experimente vorliegender Arbeit, bei denen die eine Hälfte der V δ 1-T-Zellen mit einem anti-V δ 1-Antikörper markiert wurde und die andere

unmarkiert blieb, spricht aber gegen eine deutliche Voraktivierung, da die produzierten IFN- γ -Mengen der beiden unterschiedlich behandelten Zellpopulationen annähernd gleich waren (s. Abb. 16). Auch die Ergebnisse der Caspasen-Bestimmung sprechen gegen eine Voraktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen. Es ist keine eindeutig verstärkte Caspasen-Aktivität nach Stimulation der Zellen sichtbar. Dies lässt darauf schließen, dass die Zellen vor der experimentellen Stimulation nicht über den TZR aktiviert wurden. Die durchgeführte *in vitro*-Stimulation wäre sonst eine Restimulation und könnte verstärkt Apoptose auslösen.

Ein weiterer Kritikpunkt bei der Auswertung der Ergebnisse besteht in der Frage, wie hoch die Konzentration von Zytokinen nach Stimulation sein muss, um eine Aussage über eine echte Aktivierung machen zu können. Bei den Zytokinen IL-8 und IP-10 z.B. lagen die Werte unter 100pg/ml, was die Aussagekraft mindert, da so geringe Konzentrationen evtl. keine Auswirkung auf die umgebenden Zellen haben könnten. In der Literatur gibt es verschiedene Aussagen über Zytokin-Konzentrationen. Cui (2009) bezeichnet Konzentrationen von IFN- γ und TNF- α größer als 200 pg/ml als große und Mengen kleiner als 100 pg/ml (IL-10, IL-5, IL-4) als geringe Konzentrationen von Zytokinen. *In vivo* können diese geringen Konzentrationen trotzdem lokal und in unmittelbarer Umgebung der freisetzenden Zellen biologisch relevant sein.

Caron (2005) bezeichnet die Produktion von IFN- γ bei CD4⁺ T-Zellen in Konzentrationen unter 2000 pg/ml als limitiert.

Vermutlich ist es am sinnvollsten, die Steigerung der Zytokinkonzentration um ein x-faches der Konzentration bei unstimulierten Zellen zu bewerten, wie es viele Autoren auch tun (Deetz, 2006, Caron, 2005, Wesch, 2006 etc.).

Um eine allgemein gültige Aussage über $\gamma\delta$ -T-Zellen anhand der Ergebnisse dieser Arbeit treffen zu können, sollten folgende Punkte bei der Betrachtung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Es könnte durch die Vorauswahl der Spender zur Verfälschung von Ergebnissen gekommen sein, da nur Spender mit einem gewissen Prozentsatz an $\gamma\delta$ -T-Zellen im peripheren Blut ausgewählt werden konnten, um eine ausreichende Anzahl an

stimulierbaren Zellen zu erhalten. Die Mehrheit der Spender, die einen $\gamma\delta$ -T-Zellanteil von unter 2% der PBMZ aufwies, war für eine Aufbereitung eher nicht geeignet. Durch den aufwendigen Prozess der Isolierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen und der Auftrennung der Subpopulationen kommt es zu einem deutlichen Verlust an Zellen, sodass für einen ausreichend großen Stimulationsansatz eine zu geringe Anzahl übrig bleibt. Außerdem ist es wichtig, dass eine hohe Reinheit der Zellen gewährleistet ist. Wenn beispielsweise nur wenige APZ zwischen den $\gamma\delta$ -T-Zellen zurückbleiben, können diese die $\gamma\delta$ -T-Zellen indirekt über TLR aktivieren. Kulkarni et al. (2010), die verschiedene Forschungsergebnisse über die TLR-Expression auf T-Zellen verglichen haben, beschreiben unterschiedliche Ergebnisse abhängig von der Methode der Zellisolierung. Die beste Reinheit von T-Zellen ergab sich, wenn der magnetischen Separation eine Zellsortierung am Durchflusszytometer (FACS Aria) folgte. Auch in dieser Arbeit wurden beide Methoden der Zellseparation nacheinander angewendet, und es konnte eine Reinheit der $\gamma\delta$ -T-Zellen von > 98% nachgewiesen werden (s. 3.2.4).

Es wurde außerdem darauf geachtet, dass der Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen nicht größer als 6% war und dabei der Anteil der $V\delta 1$ -T-Zellen geringer als der der $V\delta 2$ -T-Zellen, da Abweichungen davon ein Hinweis auf Infektionen oder andere Erkrankungen sein können (s. 1.1.1) und damit keinen physiologischen Zustand darstellen würden.

Die Seltenheit der $\gamma\delta$ -T-Zellen im humanen peripheren Blut ist ein generelles Problem bei der Untersuchung frisch isolierter Zellen. Kress (2005) hat deshalb versucht, diese Zellen mithilfe von Antikörpern gegen den $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor und Zytokinen zu expandieren, was besonders bei $V\delta 1$ -T-Zellen nur selten gelang.

$\gamma\delta$ -T-Zelllinien können durch Kultivierung ihren Phänotyp und ihre funktionellen Eigenschaften verändern und reagieren deshalb anders als frisch isolierte $\gamma\delta$ -T-Zellen. Deshalb wurde in vorliegender Arbeit der große zeitliche, finanzielle und logistische Aufwand betrieben, um sich ein genaueres Bild der TLR-Expression und deren funktionellen Bedeutung von *ex vivo* isolierten $\gamma\delta$ -T-Zellen machen zu können.

Die unterschiedlichen Ergebnisse, insbesondere bei Stimulation mit Liganden der TLR1,2 und 6 und TLR5 lässt auf eine individuelle Ausprägung der TLR-Expression schließen. Dabei könnte es einerseits durch vererbte Merkmale und andererseits durch Prägung mit Kontakt zu verschiedenen Pathogenen im Laufe der Reifung des Immunsystems zu Unterschieden zwischen den Individuen in der Expression von

TLR kommen. Auch Kress (2005), die eine veränderte Genexpression bei Zytokinen und deren Rezeptoren nach TLR-Stimulation von $\gamma\delta$ -T-Zellen beschrieben hat, vermutete eine individuelle Ausprägung der TLR-Expression. Wenn es keine Reaktion auf Stimulation mit PAMPs gebe, dann liege es nicht an fehlenden Rezeptoren, sondern evtl. an der falschen Auswahl von Liganden.

Zarembek (2002) beschrieb, dass die Expression von TLR-mRNA durch den Einfluss von Zytokinen, TLR-Liganden und den Kontakt mit verschiedenen Erregern bei Leukozyten hochreguliert werde. Deshalb ist die TLR-Expression, untersucht bei humanen Individuen, wahrscheinlich kein fixer Zustand, sondern auch abhängig davon, mit welchen Erregern der jeweilige Spender gerade in Kontakt gekommen war.

6. Zusammenfassung

Toll-like Rezeptoren dienen als Rezeptoren der angeborenen Immunität der Erkennung molekularer Muster, die für Pathogene typisch sind.

$\gamma\delta$ -T-Zellen sind eine numerisch kleine Subpopulation der T-Zellen und dienen vermutlich als Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die TLR-Expression auf frisch isolierten humanen $\gamma\delta$ -T-Zellen zu bestimmen, Unterschiede zwischen den Subpopulationen zu ergründen und die Beeinflussung der Zytokin-/Chemokinproduktion durch TZR-/TLR-Stimulation zu prüfen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen verschiedene TLR exprimieren. Auf Proteinebene konnten sowohl in der V δ 1-Subpopulation als auch in der V δ 2-Subpopulation TLR2, 3, 6 und 8 in deutlicher Ausprägung und TLR1 in schwacher Ausprägung nachgewiesen werden. Zwischen den Subpopulationen zeigten sich bezüglich der TLR-Expression keine deutlichen Unterschiede, außer dass TLR3 in den V δ 2-T-Zellen gelegentlich etwas stärker exprimiert wurde.

In funktionellen Experimenten zeigte sich, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen auf die Stimulation über den TZR und auf die TZR-TLR-Kostimulation mit verschiedenen TLR-Liganden mit einer Aktivierung im Sinne einer verstärkten Zytokin-/Chemokinproduktion reagieren.

In allen funktionellen Experimenten produzierte die V δ 2-Subpopulation größere Mengen an IFN- γ und TNF- α als die V δ 1-Subpopulation. Die Chemokine MIP-1 α , RANTES, IL-8 und IP-10 wurden von beiden Subpopulationen in etwa gleich großen Mengen produziert. V δ 1-T-Zellen konnten im Gegensatz zu V δ 2-T-Zellen kein GM-CSF produzieren.

Nach der Stimulation der $\gamma\delta$ -T-Zellen über TLR3 ergaben sich für V δ 1- und V δ 2-Subpopulationen die gleichen Ergebnisse. $\gamma\delta$ -T-Zellen reagieren auf TZR-TLR3-Kostimulation mit im Vergleich zur alleinigen TZR-Stimulation verstärkter Zytokin-/Chemokinproduktion.

Nach der Stimulation von $\gamma\delta$ -T-Zellen mit dem TLR7-Liganden Imiquimod kam es bei den V δ 1-T-Zellen zu keiner und bei den V δ 2-T-Zellen nur bei einigen Spendern zu einer verstärkten Aktivierung der Zellen, wenn ein zusätzlicher TZR-Stimulus gegeben war. Deshalb kann von einer individuell unterschiedlichen funktionellen Expression von TLR7 auf $\gamma\delta$ -T-Zellen ausgegangen werden.

Die Stimulation von $\gamma\delta$ -T-Zellen mit einzelnen TLR1/2/6-Liganden ergab für V δ 1- und V δ 2-Subpopulationen unterschiedliche Ergebnisse. V δ 1-T-Zellen veränderten die Zytokinproduktion nach Stimulation mit einzelnen TLR2-Liganden nicht. Bei den V δ 2-T-Zellen kam es spenderabhängig zu einer erhöhten Zytokinproduktion nach TZR-TLR2-Kostimulation. Nach Einsatz einer Mischung aus TLR1/2/6-Liganden reagierten beide Subpopulationen gleich und erhöhten beide die Zytokin-/Chemokinproduktion nach TZR-TLR1/2/6-Kostimulation. Dieses Ergebnis bestätigt die funktionelle TLR1/2/6-Expression auf $\gamma\delta$ -T-Zellen und deren interindividuelle Heterogenität.

Die Kostimulation von $\gamma\delta$ -T-Zellen mit dem TLR5-Liganden Flagellin zusätzlich zur TZR-Stimulation führte zu einer verstärkten Zytokinproduktion. Dabei unterschieden sich die Subpopulationen einerseits in der IFN- γ -Menge und andererseits darin, dass die V δ 2-T-Zellen den TZR-Stimulus neben der TLR5-Stimulation zur Aktivierung brauchten, während die V δ 1-T-Zellen schon auf die isolierte TLR5-Stimulation reagierten.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass TLR-Liganden die durch TZR-Stimulation ausgelöste Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen verstärken können. Damit dienen die $\gamma\delta$ -T-Zellen der ersten Erkennung von bakteriellen und viralen Pathogenen und der Rekrutierung und Aktivierung weiterer Immunzellen durch die Ausschüttung von Zytokinen/Chemokinen.

7. Literaturverzeichnis

1. Alexander I, Edelman ER, Methe H, 2009. Function and mode of regulation of endothelial major histocompatibility complex class II. *Cell Transplant.* 18: 255-9.
2. Baggiolini M, Clark-Lewis I, 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* 307: 97-101.
3. Beetz S, Wesch D, Marischen L, Welte S, Oberg HH, Kabelitz D, 2007. Innate immune functions of human $\gamma\delta$ T cells. *Immunobiology.* 213:173-82.
4. Behr C, Poupot R, Peyrat MA, Poquet Y, Constant P, Dubois P, Bonneville M, Fournié JJ, 1996. *Plasmodium falciparum* stimuli for human $\gamma\delta$ T cells are related to phosphorylated antigens of mycobacteria. *Infect Immun.* 64: 2892-6.
5. Bickel M, 1993. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol.* 64 (Supl): 456-60.
6. Biswas A, Banerjee P, Biswas T, 2009. Porin of *Shigella dysenterica* directly promotes Toll-like receptor 2-mediated CD4+ T cell survival and effector function. *Mol Immunol.* 46: 3076-85.
7. Biwa T, Sakai M, Shichiri M, Horiuchi S, 2000. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plays an important role in oxidized low density lipoprotein-induced macrophage proliferation. *J Atheroscler Thromb.* 7: 14-20.
8. Bonhorst J, Rasmussen T, Moen SH, et al., 2006. Toll-like receptors mediate proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia.* 20: 1130-7.
9. Boyko AN, 2010. Clinical effects and tolerability of high-dose, high-frequency recombinant interferon beta-1a in patients with multiple sclerosis: maximizing therapy through long-term adherence. *Expert Opin Biol Ther.* 10: 653-66.

10. Brenner D, Krammer PH, Arnold R, 2008. Concepts of activated T cell death. *Crit Rev Onc Haematol.* 66: 52-64.
11. Brown MA, Hural J, 1997. Function of IL-4 and control of its expression. *Crit Rev Immunol.* 17: 1-32.
12. Budd RC, 2001. Activation-induced cell death. *Curr Opin Immunol.* 13: 356-62.
13. Caccamo N, Meraviglia S, Scarpa F, La Mendola C, Santini D, Bonanno CT, Misiano G, Dieli F, Salerno A, 2008. Aminobisphosphonate-activated gammadelta T cells in immunotherapy of cancer: doubts no more. *Expert Opin Biol Ther.* 8:875-83.
14. Caron G, Duluc D, Frémaux I, Jeannin P, David C, Gascan H, Delneste Y, 2005. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: Flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN- γ production by Memory CD4⁺ T cells. *J Immunol.* 175: 1551-7.
15. Cebulla CM, Miller DM, Sedmak DD, 1999. Viral inhibition of interferon signal transduction. *Intervirology.* 42: 325-30.
16. Chang ZL, 2010. Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signalling pathways. *Inflamm Res.* 59: 791-808.
17. Cipriani B, Borsellino G, Poccia F, Placido R, Tramonti D, Bach S, Battistini L, Brosnan CF, 2000. Activation of C-C β -chemokines in human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells by isopentenyl pyrophosphate and regulation by cytokines. *Blood.* 95: 39-47.
18. Conti P, DiGiacchino M, 2001. MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy Asthma Proc.* 22: 133-7.
19. Couper KN, Blount DG, Riley EM, 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* 180: 5771-7.

20. Crellin NK, Garcia RV, Hadisfar O, Allan SE, Steiner TS, Levings MK, 2005. Human CD4⁺ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4⁺CD25⁺ T regulatory T cells. *J Immunol.*, 175: 8051-9.
21. Cui Y, Kang L, Cui L, He W, 2009. Human $\gamma\delta$ T cell recognition of lipid A is predominantly presented by CD1b or CD1c on dendritic cells. *Biol Direct.* 4:47.
22. Dagna L, Iellem A, Biswas P, Resta D, Tantardini F, Fortis C, Sabbadini MC, D'Ambrosio D, Manfredi AA, Ferrarini M, 2002. Skewing of cytotoxic activity and chemokine production, but not of chemokine receptor expression, in human type-1/-2 $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 32: 2934-43.
23. Deetz CO, Hebbeler AM, Propp NA et al., 2006. γ -interferon secretion by human V γ 2V δ 2 T cells after stimulation with antibody against the T-cell receptor plus the Toll-like receptor 2 agonist Pam3Cys. *Infect Immunol.* 74: 4505-11.
24. Dinarello CA, 1988. Interleukin-1. *Ann N Y Acad Sci.* 546: 122-132.
25. Dinarello CA, 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest.* 118: 503-8.
26. Driscoll KE, 1994. Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation. *Exp Lung Res.* 20: 473-90.
27. Eberl M, Engel R, Beck E, Jomaa H, 2002. Differentiation of human gamma-delta T cells towards distinct memory phenotypes. *Cell Immunol.* 218: 1-6.
28. Fang H, Welte T, Zheng X, Chang GJ, Holbrook MR, Soong L, Wang T, 2010. gammadelta T cells promote the maturation of dendritic cells during West Nile virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 59: 71-80.
29. Farhat K, Riekenberg S, Heine H, Debarry J, Lang R, Mages J, Buwitt-Beckmann U, Röschmann K, Jung G, Wiesmüller KH, Ulmer AJ, 2008.

- Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *J Leukoc Biol.* 83: 692-701.
30. Garcia VE, Sieling PA, Gong JH, Barnes PF, Umemura K, Tanaka Y, Bloom BR, Morita CT, Modlin RL, 1997. Single-cell cytokine analysis of gamma delta T cell responses to nonpeptide mycobacterial antigens. *J Immunol.* 159: 1328-35.
 31. Garcia-Calvo M, Peterson EP, Rasper DM, Vaillancourt JP, Zamboni R, Nicholson DW, Thornberry NA, 1999. Purification and catalytic properties of human caspase family members. *Cell Death Differ.* 6: 362-9.
 32. Gattarno M, Facchetti P, Ghiotto F, Vignola S, Buoncompagni A, Prigione I, Picco P, Pistoia V, 1997. Synovial fluid T cell clones from oligoarticular juvenile arthritis patients display a prevalent Th1/Th0-type pattern of cytokine secretion irrespective of immunophenotype. *Clin Exp Immunol.* 109: 4-11.
 33. Gattoni A, Parlato A, Vangieri B, Bresciani M, Derna R, 2006. Interferon-gamma: biologic functions and HCV therapy (type I/II). *Clin Ter.* 157: 377-86.
 34. Ghosh TK, Mickelson DJ, Fink J, Solberg JC, Inglefield JR, Hook D, Gupta SK, Gibson S, Alkan SS, 2006. Toll-like receptor (TLR) 2-9 agonists-induced cytokines and chemokines: I. Comparison with T cell receptor-induced responses. *Cell Immunol.* 243: 48-57.
 35. Gibbons D L, Haque SF, Silberzahn T, Hamilton K, Langford C, Ellis P, Carr R, Hayday AC, 2009. Neonates harbour highly active gammadelta T cells with selective impairments in preterm infants. *Eur J Immunol.* 39: 1794-806.
 36. Glatzel A, Entschladen F, Zollner TM, Kraiczy P, Brade V, Kaufmann R, Janssen O, Lengli-Janssen B, Wesch D, Kabelitz D, 2002. The responsiveness of human V delta 1 gamma delta T cells to *Borrelia burgdorferi* is largely restricted to synovial-fluid cells from patients with Lyme arthritis. *J Infect Dis.* 186: 1043-6.

37. Glatzel A, Wesch D, Schiemann F, Brandt E, Janssen O, Kabelitz D, 2002. Patterns of chemokine receptor expression on peripheral blood $\gamma\delta$ T lymphocytes: strong expression of CCR5 is a selective feature of V δ 2/ V γ 9 $\gamma\delta$ T cells. *J Immunol.* 168: 4920-9.
38. Gorden KB, Gorski KS, Gibson SJ, Kedl RM, Kieper WC, Qiu X, Tomai MA, Alkan SS, Vasilakos JP, 2005. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J Immunol.* 174: 1259-68.
39. Groskreutz DJ, Monick MM, Powers LS, Yarovinsky TO, Look DC, Hunninghake DW, 2006. Respiratory syncytial virus induces TLR3 protein and protein kinase R, leading to increased double-stranded RNA responsiveness in airway epithelial cells. *J Immunol.* 176: 1733-1740.
40. Gullo A, Foti A, Murabito P, Li Volti G, Astuto M, Stissi C, Rubulotta F, Sanfilippo F, Santonocito C, Sganga G, Ristagno G, 2010. Spectrum of sepsis, mediators, source control and management of bundles. *Front Biosci.* 2: 906-11.
41. Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, Saulnier V, Merck E, Tancredi S, Guet C, Briere F, Vlach J, Lebecque S, Trinchieri G, Bates EE, 2005. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol.* 174: 2942-50.
42. Hayday AC, 2000. $\gamma\delta$ T cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol.* 18: 975-1026.
43. Hedges JF, Lubick KJ, Jutila MA, 2005. $\gamma\delta$ T cells respond directly to pathogen-associated molecular patterns. *J Immunol.* 174: 6045-53.
44. Hewson CA, Jardine A, Edwards MR, Laza-Stanca V, Johnston SL, 2005. Toll-like receptor 3 is induced by and mediates antiviral activity against rhinovirus infection of human bronchial epithelial cells. *J Virol.* 79: 12273-9.

45. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S, 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 303: 1526-9.
46. Hintz, M., Reichenberg A, Altincicek B, Bahr U, Gschwind RM, Kollas AK, Beck E, Wiesner J, Eberl M, Jomaa H, 2001. Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human $\gamma\delta$ T cells in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*. 509: 317-322.
47. Hinz T, Wesch D, Friese K, Reckziegel A, Arden B, Kabelitz D, 1994. T-cell receptor- $\gamma\delta$ repertoire in HIV-1-infected individuals. *Eur J Immunol*. 24: 3044-9.
48. Holtmeier W, Pfander M, Hennemann A, Zollner TM, Kaufmann R, Caspary WF, 2001. The TCR- δ repertoire in normal skin is restricted and distinct from the TCR- δ repertoire in the peripheral blood. *J Invest Dermatol*. 116: 275-80.
49. Holtmeier W, 2003. Compartmentalization $\gamma\delta$ T cells and their putative role in mucosal immunity. *Crit Rev Immunol*. 23: 473-88.
50. Holtmeier W, Kabelitz D, 2005. gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chem Immunol Allergy*. 86: 151-83.
51. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G, 2002. Quantitative expression of Toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*. 168: 4531-7.
52. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM, 1993. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 260: 547-9.
53. Janeway CA, Murphy KM, Travers P, Walport M. *Immunologie*, 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin, 2009.

54. Janssen O, Wesselborg S, Heckl-Ostreicher B, Pechhold K, Bender A, Schondelmaier S, Moldenhauer G, Kabelitz D, 1991. T cell receptor/CD3-signaling induces death by apoptosis in human T cell receptor gamma delta + T cells. *J Immunol.* 146: 35-9.
55. Kabelitz D, Bender A, Schondelmaier S, Schoel B, Kaufmann SHE, 1990. A large fraction of human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells is activated by *Mycobacterium tuberculosis* but not by its 65-kDa heat shock protein. *J Exp Med.* 171: 667-79.
56. Kabelitz D, Glatzel A, Wesch D, 2000. Antigen recognition by human gammadelta T lymphocytes. *Int Arch Allergy Immunol.* 122: 1-7.
57. Kabelitz D, Wesch D, 2003. Features and functions of $\gamma\delta$ T lymphocytes: Focus on chemokines and their receptors. *Critl Rev Immunol.* 23: 339-70.
58. Kabelitz D, Oberg HH, Wesch D, 2006. Regulation of regulatory T cells: Role of dendritic cells and Toll-like receptors. *Crit Rev Immunol.* 26: 291-306.
59. Kabelitz D, 2007. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* 19: 39-45.
60. Kapp A, Zeck-Kapp G, Czech W, Schöpf E, 1994. The chemokine RANTES is more than a chemoattractant: characterization of its effect on human eosinophil oxidative metabolism and morphology in comparison with IL-5 and GM-CSF. *J Invest Dermatol.* 102: 906-14.
61. Kaufmann SHE, Kabelitz D. The immune response to infectious agents. *Immunology of Infection* (3. edition). *Methods in Microbiology*, Vol. 37: 1-20. New York: Academic Press, 2010.
62. Kawai T, Akira S, 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 11: 373-84.

63. Kishimoto T, 2010. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol.* 22: 347-52.
64. Komai-Koma M, Jones L, Ogg GS, Xu D, Liew FY, 2004. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101: 3029-34.
65. Kress E, Hedges JF, Jutila MA, 2006. Distinct gene expression in human V δ 1 and V δ 2 $\gamma\delta$ T cells following non-TCR agonist stimulation. *Mol Immunol.* 43: 2002-2011.
66. Kulkarni R, Behboudi S, Sharif S, 2011. Insights into the role of Toll-like receptors in modulation of T cell responses. *Cell Tissue Res.* 343: 141-52.
67. Kunzmann V, Kretzschmar E, Herrmann T, Wilhelm M, 2004. Polyinosinic-polycytidylic acid-mediated stimulation of human gammadelta T cells via CD11c dendritic cell-derived type I interferons. *Immunology.* 112: 369-77.
68. Kuziel WA, Greene WC, 1990. Interleukin-2 and the IL-2 receptor: new insights into structure and function. *J Invest Dermatol.* 94(Suppl): 27S-32S.
69. Lafont V, Loisel S, Liautard J, Dudal S, Sable-Teychene M, Liautard JP, Favero J, 2003. Specific signaling pathways triggered by IL-2 in human V gamma 9V delta 2 T cells: an amalgamation of NK and alpha beta T cell signaling. *J Immunol.* 171: 5225-32.
70. Larrubia JR, Benito-Martinez S, Calvino M, Sanz-de-Villalobos E, Parra-Cid T, 2008. Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 14: 7149-59.
71. Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, Mohamath R, Landers CJ, Targan SR et al., 2004. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn's disease. *J Clin Invest.* 113: 1296-1306.

72. Loetscher P, Unguccioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, Dayer JM, 1998. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature*. 391: 344-5.
73. Lubick, K., Jutila MA, 2006. LTA recognition by bovine gammadelta T cells involves CD36. *J Leukoc Biol*. 79: 1268-70.
74. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Russell GG, Rogers MJ, 2005. Nitrogen-containing biophosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res*. 20: 1265-74.
75. Marx S, Wesch D, Kabelitz D, 1997. Activation of human gamma delta T cells by *Mycobacterium tuberculosis* and Daudi lymphoma cells: differential regulatory effect of IL-10 and IL-12. *J Immunol*. 158: 2842-8.
76. Martin B, Hirota K, Cua D J, Stockinger B, Veldhoen M, 2009. Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity*. 31: 321-30.
77. McSorley SJ, Ehst BD, Yu Y, Gewirtz AT, 2002. Bacterial flagellin is an effective adjuvant for CD4+ T cells in vivo. *J Immunol*. 169: 3914-9.
78. Mönkkönen H, Ottewell PD, Kuokkanen J, Mönkkönen J, Auriola S, Holen I, 2007. Zoledronic acid-induced IPP/Apppl production in vivo. *Life Sci*. 81: 1066-70.
79. Mokuno Y, Matsuguchi T, Takano M, Nishimura H, Washizu J, Ogawa T, Takeuchi O, Akira S, Nimura Y, Yoshikai Y, 2000. Expression of Toll-like receptor 2 on gamma delta T cells bearing invariant V gamma 6/V delta 1 induced by *Escherichia coli* infection in mice. *J Immunol*. 165: 931-940.
80. Moser B, Brandes M, 2006. Gammadelta T cells: an alternative type of professional APC. *Trends Immunol*. 27: 112-8.

81. Ness-Schwickerath KJ, Jin C, Morita CT, 2010. Cytokine requirements for the differentiation and expansion of IL-17A- and IL-22-producing human Vgamma2Vdelta2 T cells. *J Immunol.* 184: 7268-80.
82. Neville LF, Mathiak G, Bagasra O, 1997. The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8: 207-19.
83. Norment AM, Bevan MJ, 2000. Role of chemokines in thymocyte development. *Semin Immunol.* 12: 445-55.
84. Oberg HH, Ly TTH, Ussat S, Meyer T, Kabelitz D, Wesch D, 2010. Differential but direct abolishment of human regulatory T cell suppressive capacity by various TLR2 ligands. *J Immunol.* 184: 4733-40.
85. Ohnesorge S, Oberg H-H, Peters C, Janssen O, Kabelitz D, Wesch D, 2009. Differential Poly(I:C) responses of human Vγ9Vδ2 T cells stimulated with pyrophosphates versus aminobisphosphonates. *The Open Immunol J.* 2: 135-42, online: www.bentham.org/open/toij
86. Olbrich H, Proudfoot AE, Oppermann M, 1999. Chemokine-induced phosphorylation of CC chemokine receptor 5 (CCR5). *J Leukoc Biol.* 65: 281-5.
87. Pechhold K, Wesch D, Schondelmaier S, Kabelitz D, 1994. Primary activation of Vγ9-expressing γδ T-cells by *Mycobacterium tuberculosis*-requirement for Th1-type CD4 T-cell help and inhibition by IL-10. *J Immunol.* 152: 4984-92.
88. Peng, G., Wang HY., Peng W., Kiniwa Y., Seo KH., Wang RF, 2007. Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway. *Immunity.* 27: 334-348.

89. Pietschmann K, Beetz S, Welte S, Martens I, Gruen J, Oberg HH, Wesch D, Kabelitz D, 2009. Toll-like receptor expression and function in subsets of human $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 70: 245-55.
90. Poccia F, Battistini L, Cipriani B, Mancino G, Martini F, Gougeon ML, Colizzi V, 1999. Phosphoantigen-reactive V γ 9V δ 2 T lymphocytes suppress in vitro human immunodeficiency virus type 1 replication by cell-released antiviral factors including CC chemokines. *J Infect Dis.* 180: 858-61.
91. Poccia F, Agrati C, Ippolito G, Colizzi V, Malkovsky M, 2001. Natural T cell immunity to intracellular pathogens and nonpeptide immunoregulatory drugs. *Curr Mol Med.* 1: 137-151.
92. Porcelli S, Brenner MB, Band H, 1991. Biology of the human gamma delta T-cell receptor. *Immunol Rev.* 120: 137-83.
93. Rapoport AP, Abboud CN, DiPersio JF, 1992. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): receptor biology, signal transduction, and neutrophil activation. *Blood Rev.* 6: 43-57.
94. Roelofs AJ, Jauhainen M, Mönkkönen H, Rogers MJ, Mönkkönen J, Thompson M, 2009. Peripheral blood monocytes are responsible for $\gamma\delta$ T cell activation induced by zoledronic acid through accumulation of IPP/DMAPP. *Br J Haematol.* 144: 245-50.
95. Rossi D, Zlotnik A, 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol.* 18: 217-42.
96. Roth SJ, Diacovo TG, Brenner MB, Rosat JP, Buccola J, Morita CT, Springer TA, 1998. Transendothelial chemotaxis of human α/β and γ/δ T lymphocytes to chemokines. *Eur J Immunol.* 28: 104-13.

97. Salaun B, Coste I, Rissoan MC, Lebecque SJ, Renno T, 2006. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J Immunol.* 176: 4894-901.
98. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA, 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 75: 163-89.
99. Schwacha M G, Daniel T, 2008. Up-regulation of cell surface Toll-like receptors on circulating gammadelta T-cells following burn injury. *Cytokine.* 44: 328-34.
100. Shojaei H, Oberg HH, Juricke M, Marischen L, Kunz M, Mundhenke C, Gieseler F, Kabelitz D, Wesch D, 2009. Toll-like receptors 3 and 7 agonists enhance tumor cell lysis by human $\gamma\delta$ T cells. *Cancer Res.* 69: 8710-7.
101. Singh SK, Girschick HJ, 2006. Toll-like receptors in *Borrelia burgdorferi*-induced inflammation. *Clin Microbiol Infect.* 12: 705-17.
102. Smits ELJM, Ponsaerts P, Berneman ZN, van Tendeloo VFI, 2008. The use of TLR7 and TLR8 ligands for the enhancement of cancer immunotherapy. *The Oncologist.* 13: 859-75.
103. Spinozzi F, Agea E, Bistoni O, Forenza N, Monaco A, Falini B, Bassotti G, de Benedictis F, Grignani F, Bertotto A, 1995. Local expansion of allergen-specific CD30+Th2-type gamma delta T cells in bronchial asthma. *Mol Med.* 1: 821-6.
104. Takeda K, Kaisho T, Akira S, 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 21: 335-76.
105. Takeda K, Akira S, 2005. Toll-like receptors in innate immunology. *Int Immunol.* 17: 1-14.
106. Tedla N, Wang HW, McNeil HP, Di Girolamo N, Hampartzoumian T, Wakefield D, Lloyd A, 1998. Regulation of T lymphocyte trafficking into lymph nodes during an immune response by the chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-1 alpha and MIP-1 beta. *J Immunol.* 161: 5663-72.

107. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J et al., 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*. 365: 768-74.
108. Thornberry NA, 1998. Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol*. 5: R97-103.
109. Toulon A, Breton L, Taylor KR et al., 2009. A role for human skin-resident T cells in wound healing. *J Exp Med*. 206: 743-50.
110. Tsukaguchi K, de Lange B, Boom WH, 1999. Differential regulation of IFN- γ , TNF- α and IL-10 production by CD4⁺ $\alpha\beta$ T cells and V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T cells in response to monocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis*-H37Ra. *Cell Immunol*. 194:12-20.
111. Vijay-Kumar M, Sanders CJ, Taylor RT, Kumar A, Aitken JD, Sitaraman SV, Neish AS, Uematsu S, Akira S, Williams IR, Gewirtz AT, 2007. Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J Clin Invest*. 117: 3909-21.
112. Ward SG, Westwick J, 1998. Chemokines: understanding their role in T-lymphocyte biology. *Biochem J*. 333: 457-70.
113. Weaver CT, Hatton RD, 2009. Interplay between the TH17 and Treg cell lineages: a (co-) evolutionary perspective. *Nat Rev Immunol*. 9: 883-9.
114. Werling D, Jungi TW, 2003. Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol*. 91: 1-12.
115. Wesch D, Glatzel A, Kabelitz D, 2001. Differentiation of resting human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells toward Th1- or Th2-phenotype. *Cell Immunol*. 212: 110-7.

116. Wesch D, Marischen L, Kabelitz D, 2005. Regulation of cytokine production by $\gamma\delta$ T cells. *Curr. Med. Chem. – Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents* 4: 153-160.
117. Wesch D, Beetz S, Oberg HH, Marget M, Krengel K, Kabelitz D, 2006. Direct costimulatory effect of TLR3 ligand poly(I:C) on human $\gamma\delta$ T lymphocytes. *J Immunol.* 176: 1348-54.
118. Yazdi AS, Guarda G, D’Ombrain MC, Drexler SK, 2010. Inflammatory caspases in innate immunity and inflammation. *J Innate Immun.* 2: 228-37.
119. Zarembka KA, Godowsky PJ, 2002. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptors mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products and cytokines. *J Immunol.* 168: 554-61.
120. Zlotnik A, Yoshie O, 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 12: 121-7.

Publikationen

Arbeiten in begutachteten Fachzeitschriften:

1. Pietschmann K, Beetz S, Welte S, Martens I, Gruen J, Oberg HH, Wesch D, Kabelitz D, 2009. Toll-like receptor expression and function in subsets of human $\gamma\delta$ T lymphocytes. Scand J Immunol. 70: 245-55.
2. Wesch D, Peters C, Oberg H-H, Pietschmann K, Kabelitz D, 2011. Modulation of $\gamma\delta$ T cell responses by TLR ligands. Cell Mol Life Sci. (im Druck).

Abstracts:

1. Pietschmann K, Beetz S, Welte S, Martens I, Oberg H-H, Kabelitz D, Wesch D. Toll-like receptor expression and functional responses to TLR ligands in subsets of $\gamma\delta$ T cells. Joint Annual Meeting of Immunobiology of the Austrian and German Societies (ÖGAI, DGfI), 2008, Wien.
2. Welte S, Pietschmann K, Marischen L, Beetz S, Martens I, Wesch D, Kabelitz D. Human $\gamma\delta$ T lymphocytes express pattern recognition receptors. 37th Annual Meeting of the German Society for Immunology Universität Heidelberg, 2007.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Immunologie des UK-SH in Kiel angefertigt. Hiermit möchte ich mich bei allen, die direkt und indirekt an dieser Arbeit beteiligt waren, recht herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dietrich Kabelitz für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können, seine wissenschaftliche Unterstützung bei der Veröffentlichung der Ergebnisse, seine Denkanstöße und konstruktive Kritik.

Frau Dr. Susann Beetz für die gute Beratung und Betreuung bei den Experimenten.

Frau PD Dr. Daniela Wesch für die Möglichkeit, die Arbeit weiterführen zu können, für die Betreuung bei der Interpretation der Ergebnisse, für die Anregungen bei der Veröffentlichung und für die Ratschläge bei der schriftlichen Zusammenfassung.

Allen helfenden Händen bei der praktischen Durchführung der Experimente, besonders Hoa Ly, Ina Martens, Sandra Ussat, Jan Lenke und Hans-Heinrich Oberg.

Frau Dr. Sabine Adam für die Beratung bei den Caspase-Assays.

Kirsten Marx für die Hilfe bei der Durchführung der CBA.

Allen Blutspendern, die nicht nur Patienten zu mehr Lebensqualität verhelfen, sondern auch die Forschung weiterbringen.

Meinen Eltern, die mir das Studium und die Fertigstellung dieser Arbeit finanziell ermöglicht haben, sowie meiner ganzen Familie, die mich ständig ermutigt und unterstützt hat.

Meinem Freund Lothar Marischen, der mich fachlich, technisch, emotional und in jeder Hinsicht unterstützt hat.

Lebenslauf

Name: Greta Kathrin Pietschmann

Anschrift: Stromeyerstraße 4, 24116 Kiel

Geburtsdatum und -ort: 09.06.1977 in Kiel

Familienstand: ledig

Eltern: Dr. Norbert Pietschmann (Arzt für Allgemeinmedizin)
Helga Pietschmann, geb. Grönwaldt (Arzthelferin,
Gymnastiklehrerin)

Schulbildung:

1983 – 1987 Grundschole: Gerhart-Hauptmann-Schule Kiel
1987 – 1996 Hans-Geiger-Gymnasium Kiel, Abschluss: allgemeine
Hochschulreife

Ausbildung und Tätigkeit als Physiotherapeutin:

1996 – 1999 abgeschlossene Ausbildung an der staatlich anerkannten Schule
für Physiotherapie an der Lubinus Klinik Kiel

2000 – 2003 Tätigkeit als Physiotherapeutin in der Praxis Christensen-Singh
Kiel

Hochschulausbildung:

2003 – 2009 abgeschlossenes Studium der Humanmedizin an der Christian-
Albrechts- Universität zu Kiel

Famulaturen

in der 1. Medizin des Städtischen Krankenhauses Kiel,
in der neurologischen Abteilung des St. Luke´s Hospitals, Malta,
in einer dermatologischen und in einer internistischen Praxis in Kiel

Praktisches Jahr

in der Chirurgie des UKSH Kiel
in der Abteilung der Inneren Medizin des Kreiskrankenhauses Rendsburg,
in der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin am UKSH Kiel

Praktische ärztliche Tätigkeit:

02.2010 – 02.2011 Assistenzärztin in der Praxis für Allgemeinmedizin Dr. med.
Norbert Pietschmann, Kiel

ab 03.2011 Assistenzärztin in der Inneren Medizin des FEK Neumünster

Promotionsarbeit

12.2006 - 04.2011: am Institut für Immunologie des UK-SH Kiel
(Thema der Dissertation: „Expression und funktionelle Bedeutung
von Toll-like Rezeptoren in $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulationen“)

